

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Bioenergética del núcleo : las ATPasas nucleares y efectos de
las radiaciones sobre ellas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María del Carmen Egido García

DIRECTOR:

Felix Sanz Sánchez

Madrid, 2015

María del Carmen Egido García

TP
1982
200



X-53-018426-4

BIOENERGETICA DEL NUCLEO: EFECTO DE LAS RADIACIONES
SOBRE LAS ATPASAS NUCLEARES

Departamento de Zoología y Fisiología Animal
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1982

Colección Tesis Doctorales. Nº 200/82

© María del Carmen Egido García
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1982
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-24648-1982

**Strahlenbiologisches Institut
der Universität Zürich**

Zürich, 9.9.1980

Direktion: Prof. Dr. Hedi Fritz-Niggli
August Forel-Strasse 7, Telefon (01) 535450
CH-8029 Zürich

C E R T I F I C A D O

Como Directora del Instituto de Radiobiología de la Universidad
de Zürich testifico que los trabajos que presenta la señora

Maria del Carmen Egido Garcia

para su tesis Doctoral en la que figura como Director el
Prof. D. Felix Sanz, han sido realizados en nuestros labora-
torios y con mi autorización.

Lo que certifico en Zürich, a petición de la intestada,
para lo que bien proceda.

Hed. Fritz-Niggli.
Prof. Dr. Hedi Fritz-Niggli

- II -

A todos aquellos, que con su jovialidad,
entrega y neutralidad, hicieron posible
la realización de este trabajo.

"

Deseo expresar mi agradecimiento :

Al Prof. Dr. Felix Sanz Sanchez, Catedrático de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid , bajo cuya dirección se realizó esta Tesis.

A Fr.Prof.Dr. Hedi Fritz-Niggli, Directora del Instituto de Radiobiología de la Universidad de Zürich, que puso a nuestra disposición cuantos medios y consejos pudieron ayudar al término de este trabajo.

Al Dr. Marc Nievergelt, del Instituto de Radiobiología de la Universidad de Zürich, por sus constantes enseñanzas e inapreciable colaboración a lo largo de la realización del presente trabajo.

Al Ing. Bjørn Fjones hago extensivo mi agradecimiento por su valiosa ayuda en el área de la construcción del programa de computadora .

Al Sr. P. Binz por su desinteresado servicio en el sector técnico-instrumental y a Dña. Cristina Büchi en el área de la fotografía . Asi mismo agradezco al resto de mis compañeros su colaboración y ayuda prestada en todo momento.

I N D I C E

	<u>Página</u>
1.- <u>INTRODUCCION</u>	1
2.- <u>MATERIAL</u>	13
2.1. <u>Células de experimentación</u>	13
2.2. <u>Soluciones y compuestos químicos utilizados</u>	16
3.- <u>MÉTODOS</u>	19
3.1. <u>Actividad celular</u>	19
3.1.1. <u>Cultivo celular</u>	19
3.1.2. <u>Control de infección</u>	22
3.2. <u>Aislamiento de los núcleos</u>	25
3.3. <u>Medida de las actividades enzimáticas</u>	27
3.3.1. <u>Actividad ATPasica</u>	27
3.3.2. <u>Medida de fosfato inorgánico</u>	28
3.3.3. <u>Determinación de proteína</u>	30
3.3.4. <u>Actividad de 5'-nucleotidasa</u>	31
3.4. <u>Método de irradiación</u>	32
3.4.1. <u>Irradiación de células</u>	32
3.4.2. <u>Irradiación de núcleos</u>	33
3.5. <u>Determinación del volumen nuclear</u>	35
3.5.1. <u>Preparación del material</u>	35
3.5.2. <u>Dispositivo de medida</u>	36
1) <u>Aparatos</u>	37

	<u>Página</u>
2) Programa	38
3) Gráficas	39
4.- <u>RESULTADOS</u>	47
4.1. <u>Actividad celular</u>	47
4.1.1. Características del crecimiento celular	47
4.1.2. Controles de infección	48
4.2. <u>Aislamiento de los núcleos</u>	50
4.2.1. Observación microscópica	50
4.2.2. 5'- Nucleotidasa	58
4.2.3. Método de Baginski (Pi)	58
4.2.4. Método Hartree (proteína)	61
4.2.5. Método Parvin / Smith (Pi)	61
4.3. <u>Actividad enzimática de los núcleos aislados</u>	61
4.3.1. Medida de la actividad ATPasica	63
4.3.2. Actividad ATPasica nuclear	63
4.4. <u>Efecto de la irradiación (1000 rad) sobre la actividad enzimática</u>	67
4.4.1. Irradiación total de las células (suspendidas en NaCl 170 mM)	67
4.4.2. Irradiación de los nucleos aislados (suspendidos en medio de aislamiento)	67
4.4.3. Comparación de las actividades enzimáticas nucleares de células o nucleos aislados , sometidos a la irradiación	68

	<u>Página</u>
4.5. Medida de las variaciones en el volumen nuclear ...	70
4.5.2. Efectos del Calcio	70
4.5.3. Efectos de EGTA	71
4.5.4. Efecto del ATP	72
4.5.5. Efecto del Tampón	74
4.5.6. Efecto de la solución Hexoquinasa	74
4.5.7. Acción de los rayos X (1000 rad)	76
4.5.8. Gráficas obtenidas en estos experimentos	77
5.- <u>DISCUSION</u>	101
5.1. <u>Actividad celular</u>	101
5.2. <u>Aislamiento de los nucleos</u>	103
5.3. <u>Actividad enzimática ATPasica</u>	106
5.4. <u>Irrradiación</u>	108
5.5. <u>Volumen nuclear</u>	109
6.- <u>RESUMEN Y CONCLUSIONES</u>	116
7.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	121

INTRODUCCION

1.- INTRODUCCION.

Desde hace tiempo es conocido el bloqueo de la división celular por irradiación con dosis pequeñas (9 R) y cuya consecuencia se manifiesta en el retraso mitótico de la siguiente división (5), sin que los mecanismos de este retraso hayan sido del todo aclarados.

Explicar los efectos de las radiaciones sobre el núcleo ha sido el punto crucial de la radiobiología ya que se trata del compartimento más sensible e importante en la acción de las radiaciones.

Los estudios bioquímicos realizados con este fin han puesto de manifiesto que la actividad ATPásica dependiente del calcio en la fracción nuclear presentaba un paralelismo con el retraso mitótico, es decir, el máximo de su actividad aparecía con un retardo igual al mitótico en células previamente irradiadas (Nievergelt, 1976).

Era pues de interés observar el efecto que las radiaciones tenían sobre las ATPasas nucleares en la interfase celular y las posibles interacciones del calcio con la membrana nuclear, quizá responsables o participantes en el retraso mitótico.

En primer lugar es pues interesante poner de manifiesto, la importancia que las membranas plasmáticas tienen en la recogida de señales extracelulares y que son transmitidas a través de ella, dando lugar a procesos intracelulares.

La opinión de que cambios estructurales en la membrana pueden estar relacionados con el crecimiento normal o transformado (tumoral) de las células es discutido desde hace tiempo, y en general se postula cada vez con más fuerza que cambios en la composición iónica del citoplasma, condicionados por la membrana plasmática, pueden regular el crecimiento celular.

Racker (1978) sugiere que el desacoplamiento de la actividad de la bomba de Na^+ es consecuente con el estado neoplásico y Balk (1973) afirma que las células cancerosas crecen autónomamente a causa de la entrada en la célula de cantidades excesivas de calcio. Tobey y col. (1971) proponen que los cambios morfológicos experimentados por las células que crecen en monocapa al pasar de la fase G_2 a la mitosis, son la consecuencia de una transformación en la composición o/y en la configuración de la membrana celular dependientes de la emigración del calcio de la superficie al interior celular.

Las relaciones entre la distribución de calcio y las variaciones de la membrana celular han sido ya demostradas por Nievergelt y col. (1976) en donde al añadir EDTA al medio de cultivo observaban como las células se desprendían de su superficie de crecimiento, sin que por este tratamiento se eliminaran componentes de la membrana (Vogel y col. 1978), aunque iba acompañado del bloqueo de la citoquinesis (Hamson, 1968; Timourian, 1974, en experimentos realizados con células de huevos de erizo de mar).

Según Knutton y col. (1979) para que se produzca la fusión de dos células somáticas y así formar una híbrida, es necesario que se originen cambios en la permeabilidad de la membrana, produciéndose fenómenos osmóticos en los que los iones calcio toman parte activa. Otros como Ahkong y col (1973), Volsky (1978), Blow (1979) y Gad (1979), sugieren que un incremento intracelular de iones de calcio inician o facilitan la fusión de membranas celulares. Metcalfe y col. (1980) han visto la influencia que Ca^{2+} tienen sobre la proliferación de linfocitos originada por mutagénicos, proponiendo que el calcio es el primer regulador del estímulo de esta proliferación, a lo que se suman las investigaciones de Gupta y col. (1981), confirmando que

el calcio actúa modulando las proteínas de la superficie celular , siendo este un efecto reversible, es decir, se recupera en ausencia del calcio.

Es sabido que la estructura de las membranas biológicas presentan una asimétrica distribución y orientación de lípidos y proteínas (Bretscher, 1971,1972, Steck y col. 1974, Larraga y Muñoz 1975, Boxer, 1975) confiriendo a ésta la capacidad de modular por medio de su asimetría gran número de informaciones transformándolas en pocas señales (regulación sobre membrana) como nos indican diversos autores en sus trabajos (Trewavas 1979, Bartfai 1978, Thorn y col. 1978, Dumont y col. 1978, Barrit y col. 1978, Eberle 1976, Schwyzer 1977). Estas membranas son mosaicos fluidos de lípidos y proteínas que poseen varios grados de movimiento, los cuales afectarán a las propiedades de éstas; así en los trabajos de Siedow y col. (1979) se observa una relación directa entre la fluidez de la membrana mitocondrial y el transpote de electrones o como en los de Herlan y col. (1979) que demuestran la influencia de la fluidez de la membrana nuclear sobre la expulsión del RNA nuclear.

Nathan y col. (1979) obtienen en sus trabajos una activación de las plaquetas por medio de trombina que va acompañada de un aumento en la rigidez de los lípidos constituyentes de sus membranas.

Otros investigadores como Maeda y col. (1979) observan que la movilidad de los receptores de membrana se modifica al tratar células de mamíferos con virus Sendai. Pasternak y col. (1980) obtienen en sus trabajos , que cambios pequeños en la fluidez de las membranas fotosensibles por acción de la luz, afectan al valor rotacional de la rodopsina y así a la transducción de la energía en el proceso de visión.

Los trabajos realizados por Shimada y col. (1979) con mitocondrias y de Baird y col. (1980) en núcleos, apoyan la existencia de una estrecha conexión entre la fluidez de la membrana de estos orgánulos y la peroxidación de los lípidos constituyentes de ellas con las consiguientes transformaciones estructurales y funcionales de sus membranas. Estos cambios debidos a la peroxidación de los lípidos han sido también observados por Nagy (1980) por los cuales se afecta la permeabilidad de la membrana, lo que se traduce en un descenso de transcripción. Estos cambios en la permeabilidad aparecen claros en las experiencias de Nagy (1980) y Koch y col. (1979) que observan un aumento en la concentración de iones en células de origen canceroso.

Bartoli y col. (1977) en sus estudios con células tumorales observan una actividad peroxidasa en membranas nucleares inversamente proporcional al valor del crecimiento del tumor, siendo estas membranas menos sensibles a la acción de peroxidantes que las de células sanas.

La fluidez de la membrana es sensible y puede modificarse también por cambios en la temperatura (Muñoz, 1979), por la presencia de iones (Giese y col. 1980), así como por la luz (Pasternak, 1980).

Es interesante resaltar los estudios realizados por Schoch y col. (1978) con membranas artificiales que dan una prueba de la relación existente entre la distribución en la superficie de membrana de moléculas e iones y la variación de voltaje transmembrana. Así mismo Hauser y col. (1978) observan que se experimenta una transformación de la resistencia de la bicapa, dependiente de la distribución de iones de calcio a ambos lados de la membrana.

Variaciones del potencial transmembrana en células sanguíneas (eritrocitos) por acción de la irradiación han sido medidas en los trabajos de Redman y col. (1977) que además encuentran una elevación de la salida de K^+ , desde el interior celular al plasma, con captación de cantidades equivalentes de Na^+ lo que produce una hipopolarización de la membrana.

Resumiendo, podemos considerar a las membranas biológicas como estructuras "espacio-temporales" que forman una continuidad dinámica con su entorno.

Refiriendonos a la membrana nuclear en particular, su importancia se pone de manifiesto al observar la conexión directa existente entre la "desintegración" de ésta y el comienzo de la mitosis, indicándonos su función de mantenimiento de un medio, en el cual el material nuclear se puede conservar en su estado de "disolución". El inicio de la mitosis parece estar relacionado con unos "factores" presentes en la célula como muestran los experimentos de Johson y Rao (1970), según los cuales al fusionarse una célula en interfase con otra en mitosis se produce una condensación cromosómica prematura en la primera, que inmediatamente pasa a la mitosis. Mazia (1972) propone que en la célula interfásica se producen unas transformaciones no específicas que traen consigo la formación de la célula mitótica.

Por otro lado, se conoce desde hace tiempo que la membrana nuclear con sus poros es permeable para iones inorgánicos, aminoácidos, así como algunas proteínas solubles de elevado peso molecular, lo que nos obliga a observar los mecanismos que pueden mantener los gradientes nucleo-citoplásmicos de iones y moléculas solubles a través de la membrana nuclear.

Es razonable suponer que las sustancias inorgánicas y orgánicas solubles están asociadas con grupos activos de macromoléculas fijas en la membrana nuclear . Esta conjetura se apoya en la observación de que el movimiento de iones inorgánicos es más reducido en el interior de la célula viva que en una disolución de electrolitos.

En el caso particular de la mitosis , se ha observado que al administrar calcio se puede reducir el retraso mitótico debido a la radiación (Whitfield, 1962) y desde el punto de vista enzimático se ha encontrado una elevada actividad ATPasica en aparatos mitóticos aislados de huevos de erizo de mar (Niki 1963, Weiser 1968 , Mazia 1972) .

Según Petzel (1972) ésta ATPasa estimulada por calcio tiene un máximo de actividad cerca de la metafase y un mínimo en la telofase de la célula en mitosis. En células de mamíferos también se ha encontrado una mayor actividad ATPasica de la fracción nuclear estimulada por calcio (Nievergelt 1976).

Como demuestran diversos autores (Bul'dyaeva y col. 1972, Bartoli y col. 1975, Kalandarishvi y col. 1977) las acciones de oxidación y fosforilación no son privativas de las mitocondrias , sino que también son realizadas por membranas nucleares. Mientras que en los experimentos realizados con núcleos de mamíferos por Crasey y col. 1959, Klouwen 1966 , Strazhevskaya 1972, observan que la radiosensibilidad de la fosforilación nuclear es relativamente alta.

Los estudios histoquímicos realizados por Klein (1966) y Jasazumi (1968) ponen de manifiesto la presencia de ATPasas unidas al núcleo en la región de los poros y según postula Harris (1977) estos poros nucleares son estructuras más estables que el resto de la membrana situada a su alrededor.

Por otro lado en el aislamiento de núcleos celulares se observa que para el mantenimiento de estas estructuras, es necesario la presencia de un mínimo de CaCl_2 , pues sino estas membranas se "desmoronan" (Wray, 1973, 1970).

La distribución de calcio intracelular parece no ser homogénea, estando además su movimiento en la célula influido por fosfato y su reparto aparece más rápido que lo esperado al aplicar la ecuación de Nernst (Bygrave 1978). Durante la primera mitosis se encontró en la región del aparato mitótico de huevos de erizo de mar, una concentración mayor de calcio, así como de fosfato que en el resto del citoplasma circundante (Timourian, 1974), además por medio de complejantes o ionóforos se observa cómo las fibras del huso son sensibles a las variaciones de la concentración de Ca^{2+} (Hepler y col. 1980).

Es pues de suponer, que en el paso de la célula de interfase a mitosis se experimente un movimiento de calcio en dirección al interior del núcleo, con lo que se provoca la disolución de la membrana nuclear, acompañada de la condensación y "precipitación" del material cromosómico. En los trabajos de Tilney (1969) se observa ya un movimiento vectorial de iones metálicos en el análisis detallado del "funchum" en huevos de erizo de mar.

Otro autores como Harris (1975), Rosenfeld (1976), Mohri (1976) Hepler y col. (1980) indican el papel importante que las ATPasas estimuladas por calcio tienen sobre la síntesis química de estructuras biológicas, por ejemplo, los microtúbulos cuya polimerización y depolimerización aparecen influenciadas por iones de calcio y controladas por un sistema de vesículas al que estarían asociadas Ca-ATPasas, cuya actividad regularía el flujo de iones de calcio del citoplasma en la mitosis. Marcando también las funciones de los microtúbulos

como los órganos relacionados con el movimiento, transporte y secreción, que a su vez aparecen asociadas a la actividad ATPasica.

Desde el punto de vista bioenergético, es conocido que el calcio "compartimentado" puede ser liberado por inducción fotónica (Kaupp y col. 1979), el transporte electrónico de la fotosíntesis se inhibe reversiblemente con una osmolaridad baja (Lockau, 1979) y la energía osmótica disponible en un gradiente de calcio transmembrana se va a convertir en energía química (Hasselbach y col. 1973), indicando la importancia que variaciones en las concentraciones iónicas tienen sobre procesos transformadores de energía.

Otros autores como Skulachev (1979) afirman incluso la existencia de diversos sistemas biológicos que utilizan la diferencia de potencial electroquímico de protones ($\Delta \mu_{H^+}$) como generadores de la energía necesaria para realizar un trabajo sin el concurso de ATP, asumiendo además, que este fenómeno no tiene lugar de una forma transitoria o excepcional, sino que es una manera general de convertir energía necesaria en muchos organismos.

De una manera paralela los estudios realizados por Jung y col. (1979) en mitocondrias, revelan que según su estado energético se hinchan o arrugan. Variaciones morfológicas semejantes se han obtenido al irradiar las mitocondrias cuyo volumen varía en función de la dosis aplicada; proceso al que puede seguir la destrucción de la estructura interna (Fritz-Niggli 1956, 1968, Ahrens 1972, Strzhavkya 1972).

En los trabajos publicados por Van Dan (1971) se señala la salida de calcio de las mitocondrias, acoplada a la síntesis de ATP, fenómeno también descrito por Rega y col. (1978) y por Wüthrich y col. (1979) en sus experimentos con eritrocitos.

El transporte de calcio como indican Fiskun y col. (1979) , Kumar y col. (1979), y Vercesi y col. (1978), entre otros, permanece electroneutral por medio de un mecanismo contratransporte $\text{Ca}^{2+} / 2\text{H}^{+}$ y que está unido a una alcalinización pasajera (Akerman 1978, Luthra y col. 1978, Madeira 1979, 1980).

Según la hipótesis de Mitchell (1967, 1968) la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, se explica por medio de la existencia de una dirección espacial de reacciones vectoriales quimioeléctricas (cadena transportadora de electrones), que se manifiesta con la formación de un gradiente de protones a través de la membrana.

Esta polaridad puede ser considerada como un estado de desequilibrio , por lo que es posible la formación de corrientes y a través de éstas se generan oscilaciones, que dependiendo del medio en que se transmiten (tamaño , forma, tipo de superficie y dirección en el compartimento), conducen a la formación de estructuras distintas y complejas denominadas disipativas (Prigogine 1978, Nicolis, 1978).

Las apariciones oscilatorias, por ejemplo, de los nucleótidos cíclicos en relación con la excitación de la célula (Hess y col. 1975, Gerisch y col. 1979) , o las fluctuaciones de la actividad ATPasica y de los protones (Edwards y col. 1978) , se puede también aclarar por medio de la funcionalidad de la membrana debido a su capacidad de poder actuar como una barrera de difusión, que además, induce a que las moléculas se muevan en una dirección determinada.

La mayoría de los trabajos expuestos tratan aspectos parciales del problema, resultando escasos o incompletos los que relacionan la influencia de las radiaciones , la concentración de calcio

y la actividad ATPasica a nivel nuclear.

Por ello ha sido necesario desarrollar un nuevo método de trabajo que nos permitiera obtener una respuesta rápida y conjunta de estos factores.

Considerando el efecto osmótico relacionado con la facultad de movimiento de moléculas disueltas, a fin de igualar concentraciones diferentes a través de una membrana semipermeable " capaz de diferenciar " entre soluto y solvente y en el caso de que este sistema semipermeable permanezca cerrado y sea flexible, se podrían medir diferencias osmóticas por medio de variaciones en el volumen de este sistema.

Según esto podríamos considerar el núcleo semejante a un sistema cerrado y flexible dotado de una membrana con capacidad selectiva , produciéndose en ella transformaciones que en parte se manifestarían en una variación del volumen nuclear.

Basandonos en estas características de la membrana nuclear y de las ATPasas relacionadas con ellas se pudo observar el comportamiento del núcleo cualitativamente en relación con el medio que le rodea y las radiaciones.

OBJETIVOS

El estudio de la fisiología del núcleo tiene una amplia bibliografía y una gran aportación de valiosos conocimientos en cuanto se relaciona con las funciones de reproducción, menos en la temática de una bioenergética, soporte de las anteriores funciones en muchos casos.

Una experimentación en núcleos sobre actividades o respuesta de la membrana a determinados estímulos requiere una serie de tratamientos, que puedan cumplir al menos las siguientes condiciones: que no se altere la morfología del núcleo, que no haya alteraciones patológicas del mismo, la no existencia en núcleos aislados de contaminaciones de elementos extraños al orgánulo y sobre todo que se mantenga en unas condiciones idóneas.

Los experimentos iniciales de este trabajo están orientados con las finalidades antedichas, buscando sistemas óptimos y estandarizados. Otro punto ha sido el cálculo de volumen nuclear siguiendo el proceder automatizado que estimamos puede cuantificar diferencias, mejor que otros sistemas propuestos. La aplicación de los resultados anteriores al estudio de los efectos de radiaciones es la fase final y aplicativa.

El volumen es una representación o reflejo del efecto osmótico, relacionado con el movimiento de moléculas disueltas a través de la membrana. Una membrana nuclear de la que quedan muchos puntos oscuros por investigar, pero dotada de capacidad selectiva y en la cual se producen transformaciones o alteraciones reflejadas en su actividad enzimática, en su función de permeabilidad y por ende reflejada en el volumen nuclear.

- 12 -

Hay una previa y larga experiencia en nuestros laboratorios sobre el cultivo de células de ovario de Hamster Chino, con diversas finalidades, lo que nos ha permitido una serie de conocimientos sobre forma de crecimiento, relación entre tiempo y densidad de inóculo, controles de investigación microscópica, etc. que nos han hecho decidir su utilización en este trabajo.

13

MATERIAL

"

2.- MATERIAL.

2.1. Origen de las células de experimentación:

Las células provienen de ovario de hamster chino (*Cricetulus griseus*) han sido preparadas y caracterizadas por American Type Culture Collection , siendo designadas como CHO-K₁ . La forma de cultivo es en monocapa .

Los frascos donde se cultivaron las células son de dos tipos , unos planos de plástico de la casa Nunc esterilizados y con una superficie de crecimiento de 25 cm² (T₃₀) y 75 cm² (T₇₅). Los otros son botellas de infusión de cristal redondas con una superficie de 385cm² aproximadamente.

2.2. Soluciones y compuestos químicos utilizados :

2.2. a) Cultivo , conservación y control celular:

Cultivo celular se hizo a partir de Hams F₁₂ (modificado) de Flow formado por : 9.84 gr.F₁₂ , 988 ml de agua , bicarbonato sódico (CO₃ HNa) de Merck 12 ml de una solución del 10%, ajustando esta solución a un pH de 7.2 con HCl, 1 N.

Por cada 450 ml de este medio (F₁₂) se añaden :

-50 ml de suero fetal bovino de Flow , 5 ml de glutamina(C₅H₁₀N₂O₃) Merck 0,2 M y según los experimentos se añadió antibióticos (5 ml). Los antibióticos estaban formado por: 10.000 u/ml de penicilina, 100 mg/ml de streptomycin y 0,25 mg/ml de fungizona , esta mezcla es de los laboratorios Gibco y la diluimos 10 veces antes de añadir a la solución de crecimiento.

Tripsina : 550 ml de una solución formada por:

- Tripsina liofilizada 2,5 % se diluyó en solución basal salina carente de Ca^{2+} y Mg^{2+} (BSS) que a la vez había sido diluida en 20 ml de agua . Ambas sustancias de laboratorios Gibco.

- PBS Dulbecco's (tampón salino de fosfato carente de Ca^{2+} y Mg^{2+}) concentrado 10 veces de Gibco, 50 ml de esta solución.

- Fenol rojo 0,5% (0,6 ml) de Gibco.

- Bicarbonato sódico (CO_3HNa) Merck 10 ml.

Cloruro sódico (ClNa) Merck 153mM fue la solución utilizada para el lavado, y recuento celular.

Solución de congelado formada por el medio " F₁₂" al que se añadió glicerina hasta un 8 % ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) de Fluka.

Todas estas soluciones o bien se compraron estériles o bien fueron filtradas por un aparato de filtración esterilizado de la firma Sartorius modelo SM 11307 y filtros de poro 0,2 μm a presión con gas también esteril filtrado (poro 0,8 μm). También se utilizó para filtrar pequeñas cantidades un aparato de la firma Milipore con filtros de 0,22 μm , modelo GSWP 02500 . Todas las operaciones de filtración se hicieron en "laminar Flow".(flujo laminar)

Soluciones de control formada por el colorante 33258 H , Hoechst (2-(2-(hidroxifenil-6-bencimidazolil)-6-(1-metil-4-pierpacil)-bencimidazol-trihidroclicóric) en una proporción de 0,5mg/ml de tampón.

- Tampón Mc Ilvane pH 5,6 formado por fosfato de sodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 200mM) y ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 100mM) Merck.

- Solución de Carnoy's , que es la solución de fijación formada por ácido acético(CH_3COOH 100%) Merck y metanol (CH_3OH 100%) Merck en proporciones (1:3).

2.2. b) Soluciones para el aislamiento de los nucleos :

- Cloruro cálcico (Cl_2Ca) 1 mM , Merck.
- Hexanodiol ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_2$) 0,5 mM , Merck.
- Tampón "Pipes" sal sódica (piperazina-N,N,-bis(2-ácido etanolsulfónico) pH 6.7, 0,5 mM , Calbiochem-Behring.
- P-40 (Nonidet) detergente no iónico 0.1 % (se añadió separadamente).

2.2. c) Soluciones empleadas en la reacción ATPasica:

- Tampón Tris/ HCl, 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})$ 0.2 M pH 7,5, Flucka.
- EDTA : ácido etilendiamin tetraacético ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$) 10 mM, Flucka.
- Cloruro cálcico ($\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot \text{H}_2\text{O}$) 50 mM , Flucka .
- Cloruro magnésico ($\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 20 mM , Flucka.
- Adenosintrifosfatodisódico ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{Na}_2\text{O}_{13}\text{P}_3$) 20 mM , Sigma.
- Oligomicina 1mg/ml , Böhring.

2.2. d) Soluciones para la medida de P_i :

- Solución standard de fosfato (KH_2PO_4) 100 μM , Merck

d₁) Método de Parvin / Smith : formado por dos reactivos

- Reactivo I : está formado por tres soluciones (A,B,C)
 - A : ácido clorhídrico (HCl) 10 N , Merck
 - B : metavanadato amónico (NH_4VO_3) 0.234 % , Merck
 - C : molibdato amónico ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 3,53% , Merck

mezclados en la siguiente forma: 1.4 ml(A) + 1 ml (B) + 2 ml (C), hasta 100 ml con agua.

-Reactivo II :n-butanol ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$) , Merck.

d.) Método de Baginski y col. : formado por tres reactivos

- Reactivo A-TCA: formado por ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) 2.9% en ácido tricloroacético ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$) 14% , ambos productos de Merck.

-Reactivo AM : Molibdato amónico tetrahidrato 1 % Flucka.

- Reactivo A-C : formado por ,ácido acético concentrado ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$).2% + citrato de trisodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 2% + metaarsenito de sodio (NaAsO_2) 0.2 %. Los tres productos que forman este reactivo son de laboratorios Merck.

2.2. e) Soluciones para la determinación protéica :

- Proteína standard seroalbúmina bovina 1 mg/ml

-Reactivo A , formado por :

hidróxido sódico 0.5 N, Merck (NaOH)

tartrato de potasio y sodio ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0.2 % ,Merck

carbonato sódico (Na_2CO_3) 10 % ,Merck.

- Reactivo B, formado por:

hidróxido sódico 0,1 N, Merck

Tartrato de potasio y sodio 0.2 % , Merck.

sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1% , Merck.

- Reactivo C formado por :

Folin -Ciocalteu (reactivo del fenol) 1 V:

Agua

15 V

2.2. f) Soluciones para la medida de la 5`nucleotidasa :

- sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 20 mM , Analar
- cloruro de níquel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 60 mM , Merck
- tampón barbital/ HCl ($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{NaO}_3$) 60 mM pH 7 , Merck
- adenosinmonofosfato ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{Na}_2 + \text{H}_2\text{O}$) 10 mM ,Sigma.

Todos estos métodos colorimetricos se midieron con un espectofotómetro Beckman DB-G con longitud de onda entre 750 y 200 nm.

2.2. g) Soluciones para la medida del volumen:

- tampón Imidazol /HCl ($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$) 40 mM pH 7 , Merck
- hexoquinasa 23 ug/ ml (1 unidad/ ml) , Böhring
- glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) 88 mM, Merck
- EGTA etilenglicol-bis-(2-aminoetil)-tetraacético ($\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$) 1 mM , Flucka.
- las soluciones utilizadas para la reacción ATPasica.

Además de los instrumentos ya descritos, se utilizaron microscopios Olympus y Zeiss

El flujo laminar utilizado durante el cultivo de las células fue de la marca Pattinder.

18-01

METODOS

11

3.- MÉTODOS.

3.1.a) Cultivo celular :

Se empieza el cultivo inoculando aproximadamente 10^6 células en un frasco de cultivo T₃₀ y (o) $4 \cdot 10^6$ células en otros T₇₅, añadiéndose de 5 a 15 ml del medio nutritivo respectivamente. A continuación se gaseifica con una mezcla de CO₂ / aire (5%) para mantener el pH ácido, ya que así se facilita el crecimiento celular y se mantiene en una estufa a 37° C hasta su utilización. Para mantener el cultivo sin contaminaciones, lo más estéril posible se realizaron todas estas manipulaciones en un "laminar Flow" dotado de luz ultravioleta.

b) Desprendimiento celular :

Después de 2 ó 5 días de cultivo dependiendo este tiempo de la procedencia de las células (congeladas, primer cultivo o de otro frasco), se decanta el medio, se añaden 5-15 ml de NaCl (153mM), para lavar con cuidado la superficie celular y no arrastrar posibles mitosis, se vacía y se añade una solución de tripsina (1-5ml). Cuando las células empiezan a redondearse (1-3 min.) se decanta esta solución con cuidado y se añaden de 2-10 ml del medio "F₁₂" se mezcla todo cuidadosamente con una pipeta Pasteur (especialmente modificada para evitar las roturas de las células y que permanezcan pegadas unas a otras en la suspensión tomándose 0.1 ml de la suspensión y se diluyen en 10 ml de NaCl (153mM) para medir en el contador de partículas el número de células por ml que tenemos en la suspensión.

Una vez controlado el número de células se hace la posterior implantación con el número adecuado de éstas, hasta llegar a la cantidad

necesaria para inocular en una botella de cultivo ($= I.F.=385 \text{ cm}^2$). Cuando las células se encuentran en el recipiente de cultivo se colocan en un aparato especialmente diseñado para este fin, que está formado de tres series de rulos girando a tres velocidades distintas, encima de los cuales se colocan las botellas en posición horizontal. Estas velocidades están en relación con el fin que se persiga: la fijación para el crecimiento o el desprendimiento de las células de la superficie cristalina. La temperatura se mantuvo siempre a 37°C .

Cuando las células ocupan casi por completo la superficie de crecimiento (cerca del final de la fase logarítmica de crecimiento) procedemos a la tripsinización para obtener las células destinadas: a los experimentos enzimáticos y medida de volumen, inoculación en otras botellas o congelación para disponer de una reserva de material. Paralelamente a este cultivo se inocular siempre un frasco T_{30} destinado a observar la morfología y posibles controles de infección del cultivo.

c) Congelado de las células :

Las células después de tripsinizadas se resuspenden en el medio "F₁₂" que contiene 8 % de glicerina como crioprotector, en una proporción de $2-4 \cdot 10^6$ células por ml (cuidando mediante gaseo que el pH no se haga más básico) y se reparten en ampollas de cristal cerrándose estas a la llama. A continuación se mantienen a 4°C durante 30 minutos, para posibilitar la entrada del crioprotector en las células, una vez pasado este tiempo se colocan en un recipiente conteniendo nitrógeno líquido que está dotado de un soporte en donde se pueden colocar las ampollas a distintas alturas, regulándose así la bajada de la temperatura en relación con el número de ampollas y el volumen de suspensión que contienen. En nuestro caso fue de $1-3^{\circ} \text{C/min}$. hasta alcanzar los -30°C , de $15-30^{\circ} \text{C/min}$ hasta llegar a -150°C e inmedia-

tamente después se sumergen en nitrógeno líquido a -196° C. De esta forma se pueden almacenar las células más de un año sin que haya pérdidas o transformaciones grandes con relación al material celular de procedencia.

d) Descongelado de las células :

Cuando se necesita material nuevo se procede al descongelado de una o más ampollas , según el material que necesitemos y el tiempo de que dispongamos hasta empezar una nueva serie de experimentos. Para esto se saca la ampolla del recipiente de congelación donde se conserva el material y se sumergen en un baño de agua a 37° C (tomando siempre las precauciones debidas a fin de evitar la explosión). Cuando el material está descongelado se abre la ampolla y el líquido que contiene la suspensión celular se inocular en las botellas y en la cantidad adecuada según el experimento a realizar(en T_{30} 10^6 cel. aproximadamente) teniendo siempre en cuenta que el proceso de congelación y descongelación trae consigo siempre una pérdida de material. Después se añade el medio requerido y se deja incubar a 37° C durante dos horas aproximadamente . Pasado este tiempo ya están la mayoría de las células fijadas a la superficie de crecimiento , por lo que hacemos un cambio del medio nutritivo para eliminar el crioprotector y el resto del material celular no vivo que permanece en suspensión y añadimos nuevo medio " F₁₂ " , volviendo a mantener el cultivo a 37° C para su crecimiento , hasta su utilización.

Las células con las que se hacen los experimentos enzimáticos no provienen directamente de las de descongelación , sino después de efectuar tres o cuatro implantaciones ya que así se consigue un material más homogéneo.

e) Control del cultivo celular :

Los cultivos se controlan periódicamente siguiendo métodos morfológicos , fluorimétricos y microbiológicos, así como también su velocidad de crecimiento .

Los métodos morfológicos se hicieron por observación microscópica del material, atendiendo no solo a su forma y tamaño, sino también a la densidad del cultivo según los días de implantación y el número de células del inóculo procedente. Para esto determinamos el número de células por ml de una suspensión base, por medio del contador de partículas , e implantamos un inóculo que contenía n , $2n$, $4n$, $6n$, en frascos T_{30} , a los que se añadió el " F_{12} " y sin cambiar este medio se dejaron cultivar hasta 8 días aproximadamente, tiempo suficiente para que las células mueran por falta de aportes nutritivos. Durante este tiempo se observaron las células en un espacio de tres horas la primera vez y luego cada 24 horas aproximadamente. En cada observación se anotó la forma de las células , su número por superficie óptica (hasta 1000 cel. / T_{30}), cuidando no tomar superficies no representativas, y al final se calcula el valor medio. Simultáneamente se cuenta el número de células en mitosis, aunque esto no se puede hacer los últimos días ya que el gran contenido de material sobrenadante lo hace muy difícil. También se anotó si las células tenían forma fibroblasto, epidermial, vacuolar , así como el tamaño y cantidad de macrocélulas (Tabla I).

Con esto se determinó la velocidad de crecimiento en función del número de células implantadas, que nos sirvió para experimentos posteriores.

El método microbiológico se hizo siguiendo las indicaciones dadas por los laboratorios Gibco Bio-Cultur Ltd, por medio del cual se detectan las posibles contaminaciones bacterianas.

TABLA I.- Observación del cultivo celular

- 23 -

Fecha/Tip. Recipiente	11.07/T ₄₀	23.07/T ₄₀	20.07/T ₄₀	21.07/T ₄₀	28.07/T ₄₀
Experimento/Nº recip.	Contrl./2	Contrl./1	Contrl./2	Contrl./2	Contrl./1
Línea cel./ Pasaje/	CHO-K ₁ /P ₆	CHO-K ₁ /P ₅	CHO-K ₁ /P ₁₃	CHO-K ₁ /P ₁₄	CHO-K ₁ /P ₁₆
Medio de cultivo	F ₁₂ ⁺ AB	F ₁₂ ⁺ AB	F ₁₂ ⁻ AB	F ₁₂ ⁻ AB	F ₁₂ ⁺ AB
Días de cultivo	1 3 8	1 8 10	1 10 18 20	1 16	3 8 16
Color del medio de cultivo	rojo naranja amarillo				
Densidad celular del monocultivo	V3 V3-2/3 2/3-3/3				
Homogeneidad celular	mala buena				
Distribución	bien mal				
Macrocelulas	muchas normal				
Morfología general-celular	pegadas redondas sin estirar fibroideas epiteloides especiales				
Material sobrenadante	mucho normal				
Tamaño celular	grande normal pequeño				
Tiempo de tripsinización	rápido < 5' medio 5'-15' lento > 15'				
Juicio general	bien regular mal eliminar				
Control PPL0					
Observaciones adicionales					

Otras de las contaminaciones que aparecen en estos cultivos son las debidas a los micoplasmas (PPLO) y para detectarlas empleamos dos métodos uno bioquímico y otro fluorimétrico o citológico.

El método bioquímico se hace utilizando isótopos y se basa en la distinta incorporación de uracil y uridina en las células infectadas. Estos controles se hicieron siguiendo el método publicado por Schneider y col. (1974).

El método citológico se hizo siguiendo el publicado por T.R. Chen (1977) con algunas modificaciones. Este se basa en la unión específica de determinados compuestos químicos fluorescentes con el DNA. Uno de estos es el colorante llamado H 33258 de los laboratorios Hoechst que elegimos para nuestros experimentos por ser de los que producen menos fluorescencia de fondo. Este colorante se utiliza diluido en un tampón especial llamado de " Mc Ilvane" a pH 5.6 en una concentración de 0.5 µg/ml. El experimento se realizó de la siguiente forma : En frascos de cultivo T₃₀ (de 1-3 por control) se añade medio nutritivo " F₁₂" carente de antibióticos, a continuación se introducen dos cubreobjetos que previamente habían sido lavados y esterilizados, con pinzas. Inmediatamente se implanta el inóculo de las células a controlar siendo su número dependiente de los días que quisieramos seguir este control, gaseándose los frascos que después de cerrados se meten en la estufa para incubar a 37° C para dejar crecer el cultivo un mínimo de tres días. Al cabo de este tiempo se sacan los cubreobjetos con un instrumento especial (diseñado en nuestro laboratorio) para evitar que las células que habían crecido sobre ellos se desprendan. Después de sacar los cubreobjetos de las botellas se lavan con una mezcla de PBS y solución de fijación en proporciones (1:2) durante 10 min.. Se meten

a continuaci3n en otro recipiente conteniendo s3lo la soluci3n de fijaci3n y se dejan 15 min. Despu3s de pasado este tiempo se secan y se tiñen con el colorante de 7-10 min. , se lavan con el tamp3n Mc Ilvan dos veces y se ponen sobre un portaobjetos que contenia el tamp3n, cerrándose los dos cristales con laca para evitar la desecaci3n de la muestra a controlar.

Este preparado se observ3 en un microscopio de fluorescencia Zeiss dotado de filtros especiales (BG-3 , UG-1 Sperrfilter 41, Obj.40 x, Obt. 1.25), siendo el tiempo de exposici3n de las fotografias hechas de 1 minuto.

Como 3ltimo control los cultivos se dejaron crecer peri3dicamente en medio nutritivo sin antibi3ticos para ver su desarrollo.

3.2. M3todo de aislamiento de los nucleos

3.2. a) Preparaci3n de las c3lulas:

Para los experimentos enzimáticos , irradiaci3n y volumen , realizados en este trabajo , se utiliz3 el material de una botella de in fusión que contenía alrededor de $2-6 \times 10^7$ c3lulas medidas con el contador celular . Las c3lulas se separaron de la superficie de crecimiento segun indicamos en la p3gina 10 .

b) Aislamiento de los nucleos :

Estos trabajos se realizaron siguiendo una combinaci3n de dos m3todos ya publicados (Wray y col. 1977 y Melero y col. 1976.) introduciendo en ellos algunas modificaciones que consideramos necesarias para nuestros experimentos.

Las células de una botella de infusión fueron lavadas con 10 ml de NaCl (153 mM), se vació y se echó 10 ml de solución de tripsina. Cuando las células empezaron a redondearse se decantó la tripsina con cuidado de no arrastrar ninguna, se añadieron 10 ml de "F₁₂" y con ayuda de la pipeta se separaron de la superficie cristalina. Una vez bien suspendidas las células en el medio se tomó 0,1 ml de esta suspensión y se diluyó en NaCl para determinar su concentración en el contador celular.

El resto de la suspensión se centrifugó durante 8 min. a 400 g con lo que obtuvimos un sedimento formado por las células y un sobrenadante que es el medio "F₁₂" que se decantó. A este sedimento se le añadió la solución de aislamiento hasta una concentración de 10^7 células por ml. En esta suspensión después de pompear bien para que las células no permanezcan pegadas, se dejaron 4 minutos (21⁰ C), pasados éstos se añadió el detergente P-40 hasta una concentración final de 0.1 %, se mezcló todo bien con la suspensión celular e inmediatamente (ya que las células empiezan a pegarse si no), se hizo pasar todo por una aguja de inyección (la jeringa es de 1 ml y la aguja tiene 0.70 x 32 mm de dimensiones) y la suspensión se mezcló bien durante 30 segundos en un "Vortex", tomándose una muestra para observar al microscopio (dotado de fase de contraste) y así ver la pureza de los núcleos.

Una parte de esta suspensión formada de núcleos y resto del material celular (N+ NS) se apartó para medir en él la actividad ATPasica y la cantidad de proteína. El resto se centrifugó a 750 g durante 5 min. obteniéndose en el sedimento la fracción nuclear (N) y en el sobrenadante el resto de los componentes citoplásmicos (NS) la cual reservamos para medir la actividad enzimática y la proteína (no olvidando recoger una muestra para observar al microscopio).

El sedimento se resuspendió de nuevo en la solución de aislamiento y se centrifugó de nuevo 5 minutos a 750 g obteniéndose así un sobrenadante que se juntó con el anterior, quedando un sedimento donde se encontraban los núcleos sin contaminaciones citoplásmicas. Estos se resuspendieron con cuidado en la solución de aislamiento hasta una concentración dependiente de los experimentos en los que se iba a emplear el material aislado (medida de la actividad enzimática, volumen, irradiación, etc), reservando siempre una muestra para observar al microscopio y un determinado volumen para determinar la concentración de proteína que tenía la fracción obtenida.

3.3. Métodos enzimáticos:

3.3. a) Medida de la actividad ATPasica:

Después de aislar los núcleos se midió la actividad enzimática en esta fracción (N), así como en el sobrenadante de ella o fracción citoplásmica (NS) y en la mezcla conteniendo las células rotas después de pasar por la inyección (N+NS). Esta actividad fue medida según la cantidad de ortofosfato formado (P_i) por hidrólisis de ATP debido a la acción enzimática para lo que se probaron dos métodos colorimétricos con algunas modificaciones (Parvin/Smith ; Baginsky y col.).

La reacción enzimática se midió en tubos dobles sumergidos en un baño a 37°C siendo el volumen final de la solución de incubación de 2 ml conteniendo : tampón Tris/ HCl 50 mM pH 7.5, $(\text{Na}_2)\text{-EDTA}^{4-}$ 1mM, CaCl_2 5mM o MgCl_2 2mM y proteína (15-40 μg). Después de preincubar la proteína en la mezcla de incubación, durante 10 min. se añadió el sustrato $(\text{Na}_2)\text{-ATP}$ en una concentración de 2 o 3 mM (según se midiera la actividad enzimática dependiente de calcio o magnesio) se mezcló todo

y en este momento se comenzó la reacción , sacandose pruebas a los 10, 20, 30 y 40 minutos desde la adición del ATP , las cuales se añadieron a los tubos que contenían los reactivos necesarios para la medida del ortofosfato.

3.3. b) Medida del fosfato inorgánico : Se compararon los resultados de la aplicación de dos métodos.

Método de Parvin / Smith : (1969)

Según este método se forma el ácido molibdovanadofosfórico que es soluble en butanol y que se puede medir colorimétricamente en la región de la luz ultravioleta (310 nm). Los reactivos utilizados son el aminovanadato-molibdato (reactivo I) 1.5 ml , n-butanol (reactivo II) 3.0 ml , el volumen elegido de las pruebas a medir o el fosfato standard y se completó hasta 6.0 ml con agua .

Debido a que las muestras conteniendo más de 0.6 μ mol de ATP interferían en la medida del P_i , se tomaron en los tiempos ya indicados solo 0.3 y 0.2 ml de los tubos que contenían la mezcla , para medir la actividad ATPasica estimulada por calcio y por magnesio respectivamente.

Para bloquear las reacciones en los tiempos deseados fue suficiente con la adición del reactivo I que era lo suficiente ácida, evitándose con esto el uso de los ácidos tricloroacético o perclórico que aceleraban la precipitación del ATP , dándonos por tanto resultados equívocos.

Después de mezclar fuertemente durante 10 segundos la muestra con los reactivos I+II , se dejaron 10 min. a 22° C (máximo 180 min.), transcurrido dicho tiempo se enfriaron en un baño de hielo/agua a 0°C

durante 10 min. y a continuación se centrifugaron a 1100 g a 5°C ,5 minutos . Con esto se eliminaban las perturbaciones debidas a la condensación de agua en la fase orgánica, siguiendose con la inmediata lectura de la fase butanol a 310 nm frente a un blanco con butanol.

Este método junto al que se hace utilizando P^{32} ATP son de los más sensibles y con menos perturbaciones que hemos encontrado.

Método de Baginsky y col.: (1967)

Debido a que el método de Parvin/Smith requería mucho tiempo hasta obtener los resultados finales, aparte de los inconvenientes que suponían la mezcla del butanol y el agua, se probó otro método más sencillo en su realización descrito por Baginski. Según este se podría medir una concentración de ortofosfato muy pequeña sin que apareciesen perturbaciones debidas a uniones lábiles de fosfato.

Se tomaron 0.4 ml de los tubos de reacción ATPasica a los 10,20, 30 y 40 minutos de añadir el substrato y se mezclaron con 0.8 ml del reactivo A-TCA centrifugandose todo a 2500 g durante 10 min. .Con cuidado se tomó un mililitro del sobrenadante , evitando contaminaciones del resto de la mezcla, y se llevo a otros tubos que contenían 0.5 ml del reactivo AM. se mezcló bien y se añadieron a estos tubos 1.0 ml del reactivo A-C. Despues de mezclar todo bien se dejaron los tubos en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente , se llevó a medir frente a un blanco en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 700 nm.

En los dos métodos descritos la formación del ortofosfato se calculó a partir de la pendiente de la regresión lineal formada por los valores de la extinción de las muestras medidas en función del tiempo , con relación a una pendiente formada con los valores de extin

ción obtenidos de la lectura de una solución standard de KH_2PO_4 . Esta sal fué previamente secada a 150°C hasta que la cantidad desecada mantuvo su peso constante.

3.3.c) Determinación de proteína : (Hartree 1972)

La cantidad de proteína utilizada en cada experimento fué determinada por el método de Hartree , pues por él se conseguía una hidrólisis mejor que por el método de Lowry , importante en el caso de nuestras ATPasas al ser estas proteínas unidas a la membrana, a lo que se suma una mejor disolución de estas.

Se prepararon los tubos de ensayo conteniendo la proteína standard en diferentes concentraciones (0-200 μg) y en otros la proteína experimental . Se diluyeron hasta un volumen final de 1 ml , se añadió 0.9 ml del reactivo A, se mezcló y se mantuvo todo 10 min. en un baño María a 50°C . Pasado este tiempo se sacaron dejándoles enfriar en otro baño hasta alcanzar los 22°C . A continuación se echaron 0.1 ml del reactivo B a los tubos , se mezcló bien y se dejó 10 min en reposo a temperatura ambiente (22°C), seguido de la adición de 3 ml del reactivo C. Se agitó todo fuertemente en un Vortex y se puso a incubarse en un baño a 50°C donde permaneció 10 min. Pasado este tiempo se los enfrió hasta una temperatura de 22°C y las soluciones se leyeron en un espectrofotómetro frente a un blanco a 650 nm.

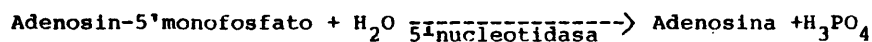
En todos estos experimentos se controlaron las posibles interferencias en la lectura que podían ser debidas a las soluciones en las que se encontraba nuestra proteína y para evitarlas se incluyeron también en el standard.

Los cálculos se realizaron como en los métodos anteriores .

3.3. d) Método 5'-Nucleotidasa : (Gerlach y Hiby, 1970)

Para demostrar la no existencia de contaminaciones citoplásmicas en los nucleos aislados utilizamos éste método, sin olvidar que al en contrarse este enzima localizado en los microsomas celulares se utiliza como referencia de la membrana celular.

El principio en que se basa es el siguiente:



Debido a que con este método no se puede medir directamente la actividad de esta enzima, lo hacemos por medio de una inhibición completa y selectiva a través de iones de N_1 . De esta forma se midió la reacción en presencia y ausencia de iones de N_1 , obteniéndose en su presencia las fosfatasas inespecíficas y en ausencia de estos iones la suma de las actividades de las fosfatasas inespecíficas y la de la 5' -nucleotidasa.

El medio contenía tampón barbital sódico pH 7.5 (30 mM), sulfato de manganeso (1mM) , con o sin cloruro de níquel (10mM). Todo se pre-incubaba a 37° C y a los 10 minutos se añadía la proteína (3-60 μg), a los 15 min., desde el comienzo del experimento, se añadió la adenosina monofosfato (1 mM) , con lo que se comenzó la reacción, sacándose pruebas a los 10, 20, 30 min. y midiéndose el P_i formado por el método de Parvin/ Smith .

Para el desarrollo del aislamiento y medida de actividades enzimática de estos experimentos se utilizaron las centrifugas siguientes: Heraus modelo "Christ" (max. 6000 r.p.m), MSE modelo "Chilspin" (max. 7000 r.p.m.) y MSE modelo "High Speed 18" (max. 18000 r.p.m.)

3.4. Método de irradiación

3.4. a) Condiciones de irradiación:

Para irradiar se utilizó un aparato de rayos X "Picker" ajustado a 200 kV y 17 mA, dotado de un filtro de aluminio de 1 mm de espesor. La dosis total aplicada fue de 1000 rad, mientras que el rendimiento del aparato era de 315 rad / minuto, medido con un dosímetro Simplex dotado de una cámara de ionización para rayos X de 80-200 kV. Este dosímetro se colocó en el espacio destinado a una jeringa, la cual se colocó en un "fantón" siendo este un aparato expresamente diseñado para nuestros experimentos, en donde además hay espacio para otras tres jeringas que están destinadas a contener las células en suspensión para irradiar. La forma de este fantón la tenemos en la lámina I.

La distancia del foco de irradiación al fantón es de 30 cm y el tiempo de 3 min. 55 seg. por 1000 rad, controlándose siempre la posición exacta del fantón a irradiar, para que sea constante.

b) Irradiación de las células:

Después de tripsinizar las células se centrifugaron a 800g durante 8 min. y se decantó el sobrenadante, las células se resuspendieron en NaCl (170 mM, que equivale a la osmolaridad de el medio donde crecen estos cultivos (Raaphorst y col., 1977)) y se metieron en jeringas de 2 ml dejando siempre una fuera sin irradiar pero bajo las mismas condiciones de temperatura y suspensión, que será después utilizado como control.

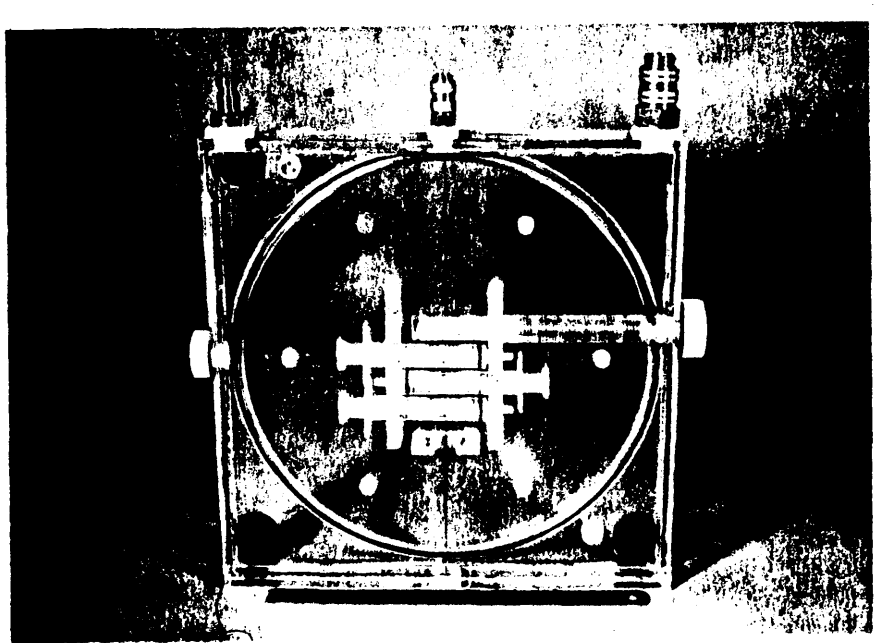
Las jeringas a irradiar se fijaron en el fantón que se llenó con agua a 22°C, manteniéndose esta temperatura durante el periodo de irradiación (lo mismo se hizo con los controles).

Después de irradiar se centrifugó la suspensión celular para eliminar el líquido en que se encontraban las células y estas se resuspendieron en la solución en la que se aislaron posteriormente los nucleos , para llevar a cabo a continuación los experimentos de medida de la actividad enzimática.

c) Irradiación de los nucleos:

En este caso primero se aislaron los nucleos como se indica en el apartado 3.2 y en el mismo medio se irradiaron inmediatamente , bajo las mismas condiciones que hemos descrito anteriormente con las células completas , seguido por la inmediata medida de la actividad ATP-ásica.

En el caso de que los nucleos aislados e irradiados fueran destinados a la medida del volumen , fueron sometidos a una serie de pasos que describiremos a continuación , antes de irradiar.



Lam. I.- Fantón de plexiglas utilizado para irradiar las células
o nucleos en suspension .

3.5. Método para la determinación del volumen nuclear medio

3.5. a) Preparación del material de experimentación:

Los nucleos se aislaron como se indica en 3.2 , y se incubaron en un medio que contenía las mismas sustancias que para medir Ca-ATPasa pero en las siguientes concentraciones : Tris/HCl 40 mM pH 7,6 o Imidazol /HCl 40 mM pH 7,2 (ambos a 37°C), EGTA (de 0-1 mM), CaCl₂ (de 0.33- 8.3 mM), ATP (0- 1.7 mM). Siendo el volumen final de 1.2 ml. Este medio se incubó a 37° C durante 5 minutos y se añadieron los nucleos aislados suspendidos en la solución de aislamiento (0.4 ml de una suspensión celular que contenía 10⁷ células / mililitro), dejándolo todo 40 min. a la misma temperatura de preincubación.

Transcurrido este tiempo se hicieron generalmente dos series de experimentos con este incubado : A) en estos se añadió la solución hexoquinasa y en otros B) no se añadió.

En la serie (A) formada por los tubos que contenían la mezcla ATPasica se echaron 0.5 ml de la solución hexoquinasa(formada por: enzima 23 µg/ml (1 unidad/ml) + glucosa 88 mM y CaCl₂(de 0-5 mM)). Esta mezcla se puso a incubar durante 10 min. a 37° C , pasado este tiempo se dejaron enfriar a temperatura ambiente (22°C) en un baño de agua y sal. A continuación se irradiaron unos y otros se dejaron como controles (ver 3.4.c). El motivo del tratamiento con hexoquinasa era la de eliminar el ATP sobrante de la reacción ATPasica , pero sin olvidar que con este tratamiento se produce una dilución de todos los componentes , cosa muy importante en el caso del calcio.

Con la serie (B) despues de transcurridos los 40 minutos , se dejaron enfriar hasta 22° C.

Después de irradiados o no , se tomó 1 ml de cada tubo y se mezcló con 14 ml de NaCl (153 mM), para medir en el contador celular las variaciones del volumen nuclear, dependiente de los tratamientos realizados (ATP, EGTA, pH , CaCl_2 , hexoquinasa , e irradiación).

3.5. b) Factores a tener en cuenta en el método de medida:

- Dilución de la muestra para el recuento

La medida del volumen en las condiciones en que se midió la actividad ATPasica no fué posible debido a la técnica de medida, que se basa en el desplazamiento de un electrolito en un capilar. Mientras que en el test ATPasico se utiliza una concentración de electrolito muy pequeña , en la medida de volumen al trabajar en estas condiciones se obtenía una gran interferencia de fondo que impedía su medida. Debido a esto los nucleos después de mantenerlos bajo condiciones de ATPasa se diluyeron 15 veces en una solución de NaCl (153 mM) en la que se midió la variación del volumen. Esto puede tener un efecto recíproco de la solución salina con los nucleos , que no podemos descartar, pero teniendo en cuenta , que la medida de estos tiene lugar al final de la reacción ATPasica y a temperatura ambiente (22°C) e inmediatamente después de mezclar, los resultados son paralelos a los obtenidos en la medida de la actividad ATPasica de otros experimentos anteriores y la influencia de la dilución es de poca importancia. Además según trabajos publicados (Pisareva y col. 1971, Bul'dyaeva 1972, Letziger 1979) los cationes monovalentes tienen efectos recíprocos con las histonas y los bivalentes los tienen con la membrana nuclear.

- Temperatura durante el recuento

Como no siempre podíamos efectuar el recuento inmediatamente después de las incubaciones (por ejemplo en los experimentos en que se quería ver el efecto de la irradiación) se mantuvieron éstas a temperatura ambiente en un baño de agua. Con esto se intentaba mantener los resultados constantes (ver influencia de la temperatura en la actividad enzimática) , pero al tener lugar estos experimentos después de terminar la incubación no va a influir mucho en los resultados finales, aunque de todas maneras estos se van a evaluar más cualitativamente que cuantitativamente.

3.5. c) Dispositivo de medida :

- Aparatos :

- Contador celular , Coulter Counter modelo ZBI de "Coulter Electronics LTD. Maxpende Herts England".
- Capilar con un diámetro de 50 μ m
- Computadora : Digital PDP 11 RT-11 SJ (VO3-02)
 - Computer display Terminal
 - Terminal de trabajo Textronix 4010-1
 - Teletipo-Terminal Digital
 - Digital Securit II modelo LA 36 CJ
- Uniones entre el contador celular y la computadora:
 - ORTEC Power Supply modelo 402H
 - Linear Gate and Strecher : Camberra 1454

- Programa de computadora:

Para la construcción del programa se tuvieron en cuenta los

siguientes puntos : rapidez en la valoración de los resultados, sencillez en la metodología , clara exposición de los resultados .

El programa está formado de dos partes (ver diagrama bloque), una parte standard y otra para el recuento de las células, para lo que utilizamos dos "puffers de computadora". Uno es el de trabajo relacionado directamente con el recuento celular directo de cada experimento y otro el de referencia que es el representante del recuento anterior al de la muestra que medimos, o al que hacemos referencia.

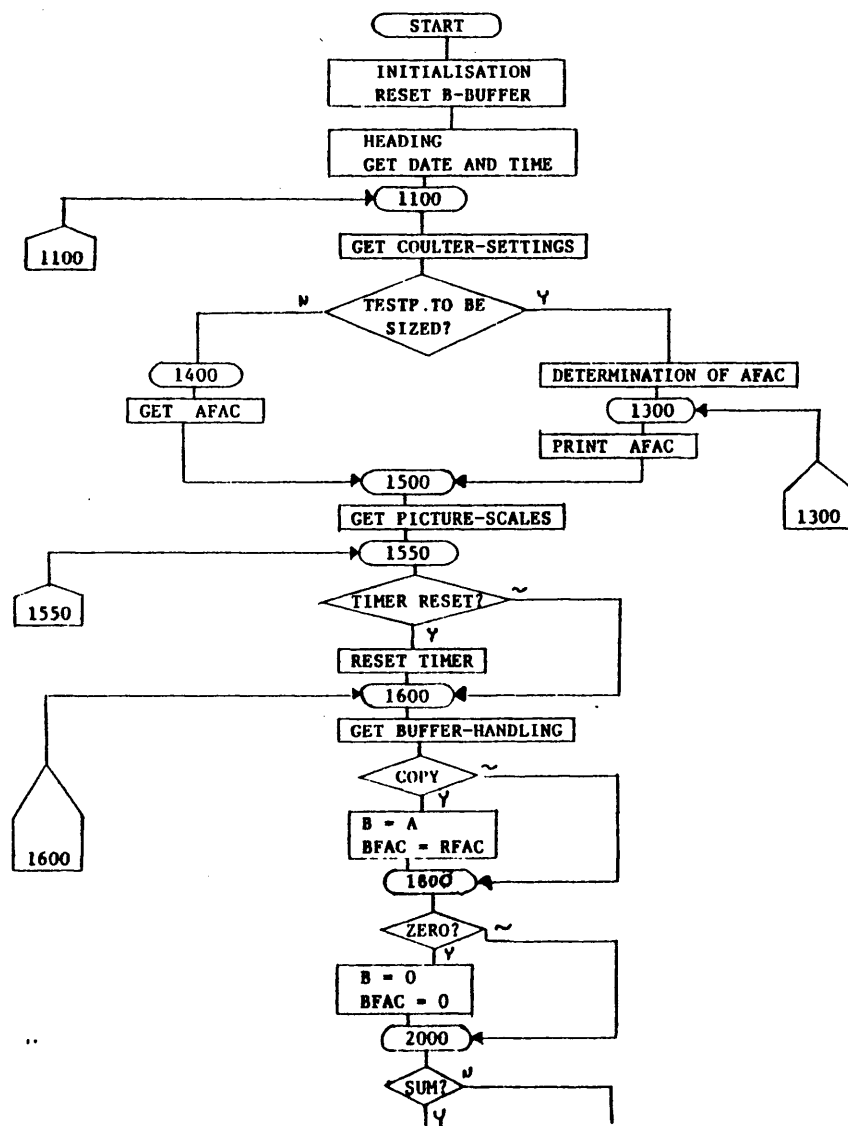
El objeto de la utilización de estos dos sistemas de "buffers" es el obtener en la misma proyección la curva de referencia y aquella que resulta del experimento que medimos. El programa está pues construido de tal forma que permite un diálogo continuo con lo que se obtiene un cálculo mejor de la medida del volumen nuclear.

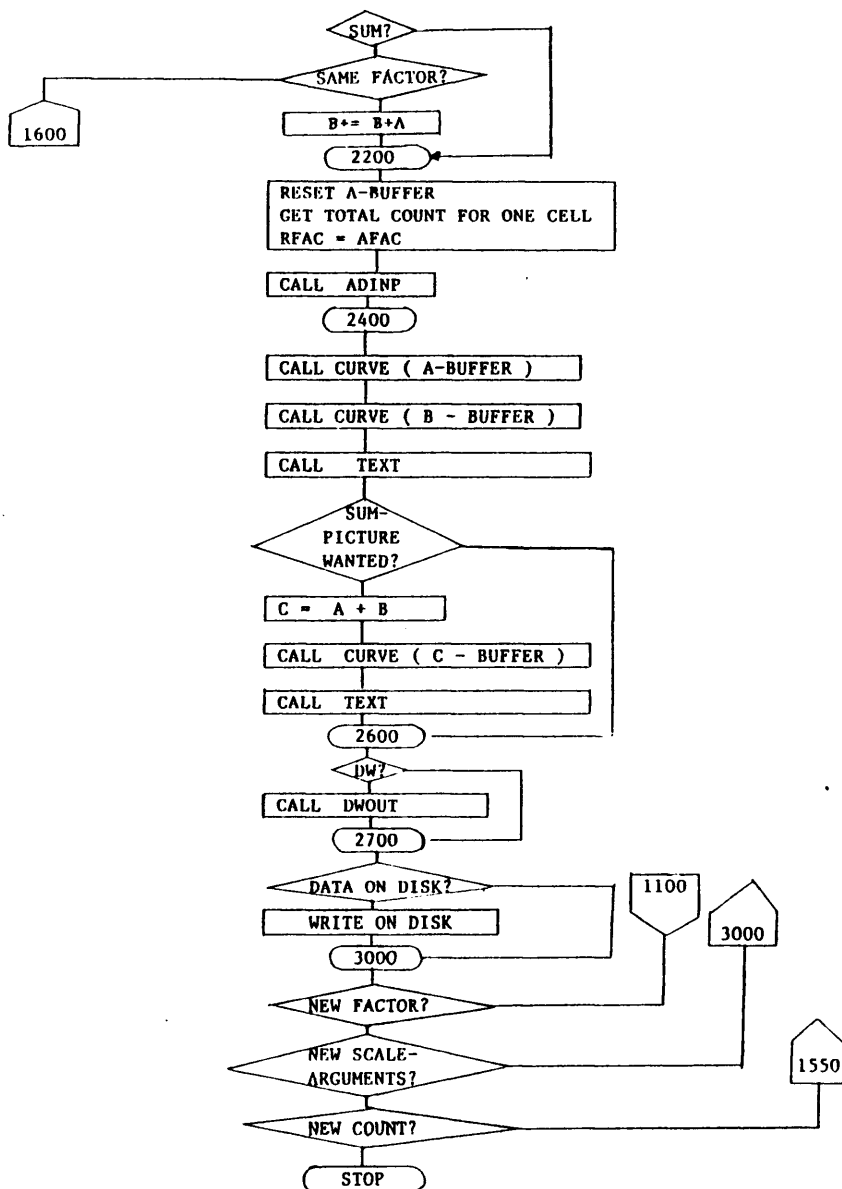
---- Proyección en la pantalla e interpretación de esta:

En las fotos 2,3,4 se señalan los valores iniciales de regulación, calibración, tiempo , forma de la proyección , determinación del factor de proporcional y una curva patron hecha con partículas de un diametro conocido.

En la foto 2 , después de dar la fecha y tiempo en que se empezó el experimento , se definen la disposición del contador de partículas : I =presenta la regulación de la corriente que pasa por el orificio del capilar (dependiente del tamaño de las partículas a medir). Z=define la amplificación de la señal. Grad y --> =están destinados a recoger las variaciones en la concentración del electrolito (en nuestros experimentos no lo utilizamos, por eso vemos el mismo valor) en que se encuentran suspendidas las partículas a medir. El acoplamiento tiene lugar al alcanzar el impulso más frecuente $\frac{2}{3}$ de la altura del

CONSTRUCCION DEL PROGRAMA





```

*****
* INSTITUT FÜR STRAHLENGEOLOGIE - UNI ZÜRICH *
* PROGRAM : PARTICLE SIZE DISTRIBUTION *
* EQUIPMENT : TOPIS AND COULTER COUNTER MOD 201 *
* PERFORMERS : NIEVENGELT, F. JONES *
*****

GIVE UP DATE : (DD-MMM-JJ) 04-OCT-79
GIVE UP TIME : (HH:MM) 19:00
COULTER SETTINGS : - Z = 2
                  - I = .354
                  - GRAD = .153
                  - --> = .153

DO YOU WANT TESTPARTICLES TO BE SIZED ? (Y OR N) : Y
-----> DETERMINATION OF PROPORTIONAL FACTOR:
TESTPARTICLES-DATA: - DIAMETER = 9.12
                   - TOTAL COUNT = 20000
SCANNING STARTS ON CARRIAGE RETURN !!
PROPORTIONAL FACTOR = 1.104

CHOOSE SCALES FOR PICTURE: - MS =
                          - MN = 20
                          - SCAL = 200

IS INTERVAL TIMER TO BE RESET ? (Y OR N) : Y

CHOOSE BUFFER-WINDING :
(POSSIBILITIES: COPY, ZERO, AND) : 2
TOTAL PARTICLE-COUNT = 20000

```

Fig. 2 , - Descripción de los parámetros utilizados en la construcción del programa , para medir la distribución del volumen nuclear.

osciloscopio incorporado en el contador celular

En las siguientes líneas (7-12) vamos a encontrar una serie de datos necesarios para la determinación del factor de proporcionalidad. Para esto necesitamos de la ayuda de partículas cuyo diametro es conocido y que se encuentra en el intervalo en el que esten las partículas con las que experimentamos. Como este factor es dependiente también de la colocación (sintonización) en el contador, determinamos su valor en todas las posiciones más utilizadas de I y Z , sin olvidar que en las posiciones límites no se obtenía una solución lineal .Debido a esto se procuró que al cambiar las posiciones durante el experimento (ya que en el experimento modelo se salía de los límites fijados),se hiciera de tal manera que la curva de distribución quedara lo menos afectada posible (no debiendose afectar con este cambio más de dos posiciones de Z).

En todas las medidas hechas para determinar el factor se hicieron controles de recuento ya que es necesario que el orificio de apertura del capilar esté siempre limpio , pues en caso de suciedad éste es más pequeño dando resultados falsos. Este control se realizó de una manera óptica por medio del contador (osciloscopio) y de una manera acustica por la computadora y el contador celular (se basa en la frecuencia con que se oía la señal o su abstención, lo que denunciaba inmediatamente una obstrucción del orificio).

En las líneas 13 a 15 se dan las medidas de la proyección por los términos : X_{m} = límite inferior ; X_{n} = límite superior ; SCA = número de canales (máximo 200).

Línea 16 = reloj incorporado : indica el momento en que se empezó a contar la muestra experimental y que después en las fotos de los resultados aparece como " Clock" . En el caso de que después de cada

recuento no se lleve el tiempo a 0, éste se sumará . Cuando se trata de una calibración o ajuste el tiempo estará en relación con el "buffer" A

En las líneas 17-18 aparecen los términos siguientes:

COPYA = Indica el contenido del "buffer" A y se copia en "buffer" B

ZERO B = Por medio de él se borra el "buffer" B.

AAND B = Se suman el contenido de A al "buffer" B , quedando el primero borrado.

Ningún dato : En éste se borra el "puffer A" al empezar con el siguiente recuento . El "puffer B" permanece invariable.

Figura 3: Es una continuación de la construcción de la medida del experimento , empezada en 3.

En la línea 1 se suma el contenido del buffer A con el de B, pero permaneciendo el contenido de ambos invariable (cosa que no ocurría en AAND B).

De las líneas 4-12 aparecen los mismos términos que habíamos visto en la fig. 2 , es decir tiene lugar un nuevo recuento, pero basandonos en los resultados de (2). En el caso de tener que cambiar el amplificador tenemos que calibrar de nuevo.

Figura 4: En la que vemos dos partes, un texto y una curva.

En el texto que no está encuadrado se especifica el experimento que vamos a medir (parte superior) mientras que en la parte derecha se encuentran la fecha y los ajustes del contador celular , relacionados con el buffer correspondientes (A,B,Z,I,K).

Todo lo que está encuadrado corresponde a los resultados obtenidos con los "buffers" A y B , especificandose lo siguiente:

MEAN DIAMETER , corresponde al diametro medio (la unidad es μm) cuyo valor viene dado por la columna que primero contiene el número

```

DO YOU WANT THE SUM TO BE DRAWN ? (Y OR N) :
DATA ON DEC-WRITER ? (Y OR N) :
DATA ON DISK ? (Y OR N) :
NEW START WITH NEW FACTOR ? (Y OR N) : Y
COULTER SETTINGS : - 2 = 5
                   - 1 = .25

DO YOU WANT TESTPARTICLES TO BE SIZED ? (Y OR N) : Y
-----> DETERMINATION OF PROPORTIONAL FACTOR:
TESTPARTICLES-DATA: - DIAMETER = 4.95
                   - TOTAL COUNT = 20000
SCANNING STARTS ON CARRIAGE RETURN !!
PROPORTIONAL FACTOR = 0.254

CHOOSE SCALES FOR PICTURE: - MS =
                           - MN = 20.
                           - SCAL = 100

IS INTERNAL TIMER TO BE RESET ? (Y OR N) : Y
CHOOSE BUFFER-HANDLING :
(POSSIBILITIES: COPY, ZERO, AND OR) : C
TOTAL PARTICLE-COUNT = 20000

```

Fig. 3.- Continuación de la construcción del programa de la
fig.12

p1
- 44 bis -

```
DO YOU WANT THE SUM TO BE DRAWN ? (Y OR N) :  
DATA ON DEC-WRITER ? (Y OR N) :  
DATA ON DISK ? (Y OR N) :  
NEW START WITH NEW FACTOR ? (Y OR N) : Y  
CULTUR SETTINGS : - 2 = .5  
                  - 1 = .25  
  
DO YOU WANT TESTPARTICLES TO BE SIZED ? (Y OR N) : Y  
-----> DETERMINATION OF PROPORTIONAL FACTOR:  
TESTPARTICLES-DATA: - DIAMETER = 4.95  
                   - TOTAL COUNT = 30000  
SCANNING STARTS ON CARRIAGE RETURN !!  
PROPORTIONAL FACTOR = 0.254  
  
CHOOSE SCALES FOR PICTURE: - NS =  
                          - NN = 20,  
                          - SC = 100  
  
IS INTERVAL TIMER TO BE RESET ? (Y OR N) : Y  
CHOOSE BUFFER-HANDLING :  
(POSSIBILITIES: COPY,ZERO,ANDS) : C  
TOTAL PARTICLE-COUNT = 20000
```

Fig. 3.- Continuaci3n de la construcci3n del programa de la
fig. 2

de partículas (nucleos) que hemos fijado como tope , lo que no siempre coincide con el valor medio de la distribución.

TOTAL VOLUME , siendo la unidad de medida también μm^3 , nos indica el volumen total de todas las partículas contadas. Este dato tiene mayor importancia al relacionarlo con el momento del recuento dado en " Clock", ya que de esta forma es una referencia de la intactibilidad de las partículas que medimos (teniendo en cuenta que las suspensiones mantengan la misma concentración).

MEAN VOLUME : la unidad es μm^3 / partícula por el que obtenemos el valor medio del volumen por partícula. Este dato es de gran importancia , pero su cálculo no fue siempre exacto debido a que las partículas no se distribuían linealmente en el intervalo donde se encuentran principalmente las de mayor tamaño de la población ; por esta razón vemos un pico al final de la curva que lógicamente afectará a la curva principal.

BANDWIDTH : corresponde al ancho de la banda , su unidad es en μm . Este dato tiene valor solamente en el caso de que la curva de distribución tenga forma simétrica respecto al eje Y .

PROYECCION DE LA CURVA: en esta vemos un texto a la izquierda donde se nos indica que los cálculos se hicieron en relación al % y los valores imprimidos debajo corresponden a la clase que contiene mayor número de partículas (es otra forma de poder controlar la exactitud del recuento). A la derecha de la curva nos encontramos:

Clock o tiempo en que se realizó la medida

Grad y ---->, donde se dan las variaciones de la concentración salina de la misma manera que aparece en la fig (2) y que tampoco utilizamos en estos experimentos.

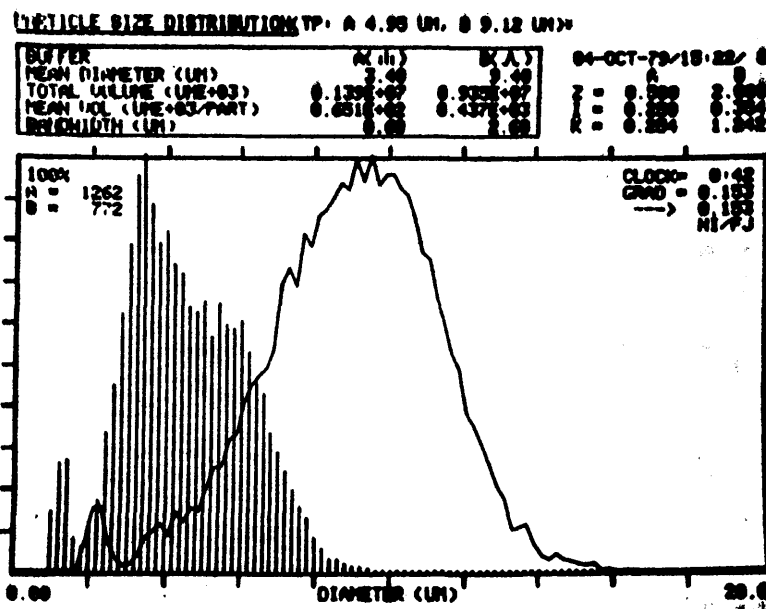


Fig. 4 .- Proyección de la curva de un experimento modelo y los parámetros utilizados en ella.

21 01

RESULTADOS

”

4.- RESULTADOS.

4.1. ACTIVIDAD CELULAR

4.1.1. Características del crecimiento:

Al implantar inóculos de células en cantidades dadas por n , $2n$, $4n$, y $8n$ ($n = 0.7 \times 10^5$ células / T_{30}) observamos lo siguiente :

- 1) Conseguimos una caracterización de la línea CHO en crecimiento monolaminar .
- 2) Observamos la existencia de un mínimo de 48 horas, por debajo del cual las células apenas si se dividen, sino que crecen y se fijan a la superficie del recipiente que las contiene . Una vez alcanzado este estadio se ve que la pendiente de reproducción celular se acentúa, estando ésta en relación con el número de células implantadas.
- 3) No se ve de todas formas un crecimiento exponencial como ocurre p. e. en las bacterias o en otros microorganismos.
- 4) El máximo de células por superficie de crecimiento lo alcanzan en un intervalo de tiempo muy pequeño y además independiente del número de células del inóculo.
- 5) A la vista de estos resultados podemos calcular al cabo de cuanto tiempo tendremos un número determinado de células (relación entre el tiempo y la densidad del inóculo).
- 6) Hay un número máximo de células (según el tipo de frasco de cultivo varia un poco) del inóculo hasta conseguir el máximo necesario para un experimento y que está entre las 38 y las 48 horas , siendo su número alrededor de 2×10^7 cel/ botella de infusión. Esto quiere decir que al implantar más células , tendremos más material en el

en el sobrenadante pero la superficie de crecimiento no estará cubierta . Una explicación a este fenómeno podría ser que el número de células en fase G_0 aumenta al elevarse la concentración de células por ml en la botella de cultivo nueva y permanecen en esta fase . Además de esto las células no aparecen en su forma epitelial típica sino redondeada, con espacios vacíos de células (lo que muestra que no han alcanzado el máximo) .

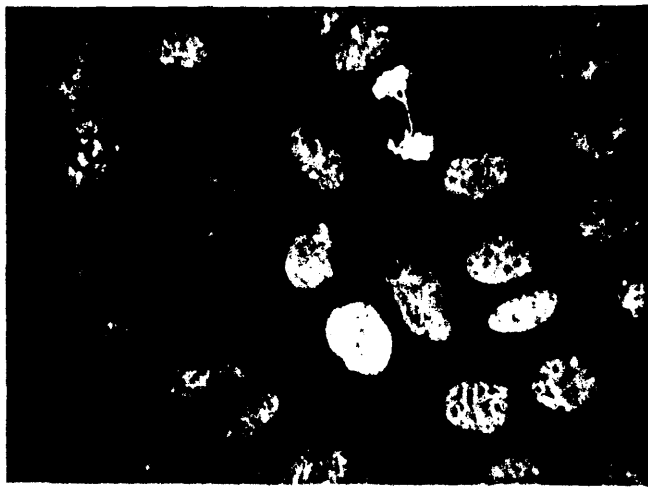
7) Se obtiene también cual es el mínimo de células por inóculo, debajo del cual , éstas tardan mucho en alcanzar su estado de división . En este caso necesitamos alterar las características del tampón modificando su pH máximo por gasificación y a pesar de ello no se consigue el máximo esperado.

4.1.2. Controles del cultivo:

Los controles se hicieron regularmente; al principio aplicando el método radiactivo que se basaba en la relación entre uridina y uracil, pero al encontrar en nuestros resultados que estos no se mantenían constantes, unido a lo costoso y lento con relación al otro método nos hizo aplicar únicamente este método citológico.

Por el método de Chen y col. se ven perfectamente teñidos los núcleos , nucleolos y dependiendo del papel utilizado , se ponen de manifiesto más o menos claramente las contaminaciones debidas a los micoplasmas en el caso de que los cultivos estén contaminados.

Según el tiempo de exposición y tipo de papel elegido para las fotografías posteriormente, se podía detectar más o menos claramente las posibles contaminaciones . Así en papel A_3 (Lam. II) se veían los núcleos muy bien , al igual que sus contornos con muy poca fluorescencia fondo , y aparentemente libre de micoplasmas.



Lam. II.- Observacion de un cultivo de células
con contaminación de PPLO, por el método
de Chen . (papel "blando")



Lam. III - la misma observacion que en fig. 2 , pero
en otro tipo de papel de fotografia ("duro")

Cuando las fotos se hicieron en papel del tipo A₅ , a pesar de ser la misma muestra, se observa una fluorescencia mayor de fondo, los nucleos presentan sus contornos difusos, no viendose su estructura interna como en el otro papel , pero los micoplasmas (pequeños puntos blancos situados alrededor del nucleo) se ven más claramente (Lam III).

Debido a estas ventajas y desventajas de ambos tipos de papeles fotogràficos elegimos uno o el otro segun el preparado aparecia en el microscopio fluorimètrico.

Ademas de este método , se llevaba un diario del aspecto morfològico del cultivo en frascos T₃₀ en las que no se cambiaba el medio de crecimiento , pues segun Tobey y col. (1971), si las células estan infectadas alcanzan el estadio estacionario , siendo su concentraciòn la mitad de cuando el cultivo no està contaminado, a lo que se une el aparecer en el medio más material en suspensiòn debido a que mueren antes (separaciòn de la superficie de crecimiento).

4.2. AISLAMIENTO DE LOS NUCLEOS

4.2.1. Observaciòn microscòpica:

Los experimentos realizados para aislar los nucleos se fueron siguiendo con el microscòpio y segun estas observaciones se iban modificando los tratamientos , hasta conseguir los resultados deseados , despues de los cuales se iban a someter a los controles enzimàticos , para ver las posibles contaminaciones y su funcionalidad.

En la Lam IV las células se encuantran en el medio de crecimiento " F₁₂ " despues de tripsinizar para separarlas de la superficie de crecimiento . En ella se puede observar como las células poseen unas expansiones citoplasmàticas propias de esta línea , pero que desaparecen

al resuspenderlas en la solución salina de NaCl (153 mM), como vemos en la lámina(V) , en donde además el tamaño de las células ha disminuído , lo que ocurre cuando se encuentran en esta solución un determinado tiempo , ya que por otros experimentos hemos visto que inmediatamente de resuspender las células en NaCl tiene lugar un pequeño hinchamiento.

En las láminas VI y VII vemos el efecto de los medios de aislamiento de Melero y col. (VII) y de Wray y col (VI). En ambos aparecen las células hinchadas con la estructura nuclear difusa pero completos.

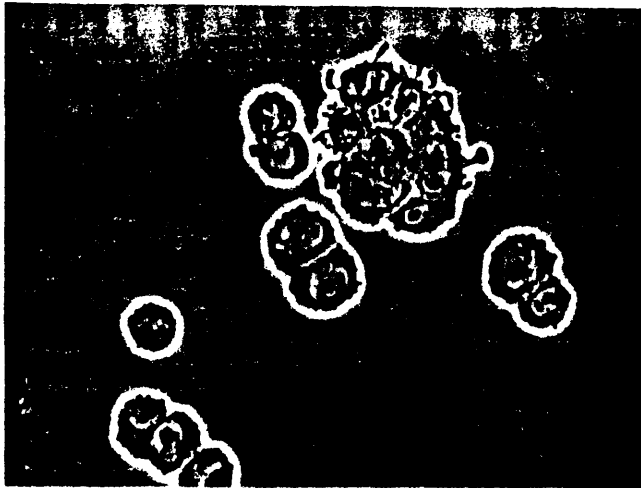
Por el método de Melero obteníamos después de pipetear , nucleos acompañados de restos citoplásmicos (lam. VIII) que por su tamaño sedimentaba en la centrifugación con los nucleos y por lo tanto difícil de separar(lam.IX). Cuando pipeteábamos más tiempo o más intensamente nuestras células, éstas se rompían debido quizá a sus características. Posteriormente al aplicar el test de la nucleotidasa encontrábamos un resto de actividad que nos indicaba contaminaciones citoplásmicas.

Debido a estos resultados aplicamos el método de Wray en donde observamos, que si bien el medio de aislamiento reunía las condiciones deseadas , al pasar la suspensión celular por la inyección , gran parte del material citoplásmico permanecía pegado a los nucleos (lam. X), por cuya razón recurrimos a un detergente .

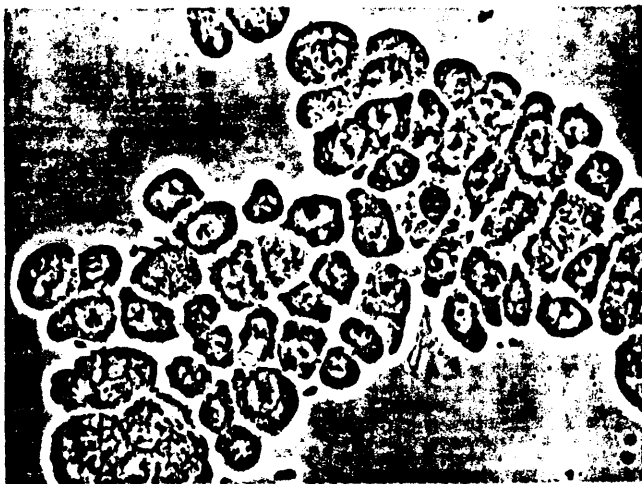
En la lámina XI vemos las células suspendidas en el detergente pero en una concentración 10 veces menor a la indicada por Melero. El motivo de la reducción en la concentración , es el evitar que se afectara al sistema con el que trabajamos , que está unido a la membrana nuclear lo que significaba una interferencia de estas uniones por acción del detergente. Otro punto a tener en cuenta es que dependiendo del estado de las células , las acciones del detergente y el efecto mecánico

(paso por la inyección) tenían que tener lugar de tal manera que las células no explotaran antes del tratamiento mecánico, sino por acción de este, ya que en caso contrario se obtenían fragmentos citoplásmicos de gran tamaño que permanecían pegados al núcleo y difícil de separar posteriormente por centrifugación. Por esta razón controlamos el tiempo de suspensión de las células en la solución de aislamiento sin y con detergente, obteniendo que después de 4 minutos de suspensión en la solución de Wray, si se añadía el detergente y se inyectaba inmediatamente, las células que se habían contraído un poco, pero sin llegar a explotar por el tratamiento con el detergente, al pasarlas por la inyección se producía la rotura de la membrana celular, quedando pequeños restos de material citoplásmico pegados a los núcleos de más fácil separación por centrifugación de éstos, (lam. XII y XIII).

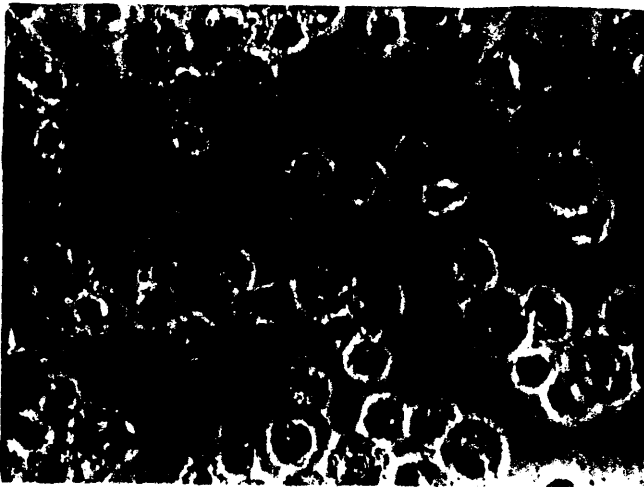
Así combinando los dos métodos e introduciendo pequeñas modificaciones, conseguimos unos núcleos en donde al controlar la actividad enzimática de la 5-nucleotidasa se nos confirmaba su pureza, pues toda la actividad permanece en el sobrenadante y no quedan restos en los núcleos. No olvidando los controles hechos por los autores de estos métodos que son coincidentes.



Lam. IV.- Células suspendidas en el medio de crecimiento "F₁₂".



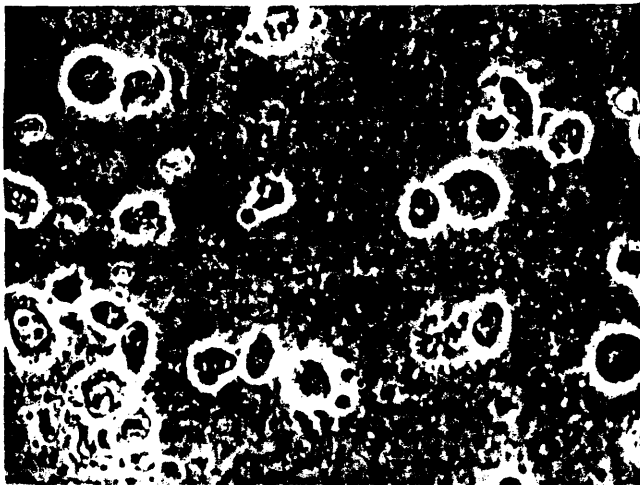
Lam. V.- Células suspendidas en 153 mM NaCl.



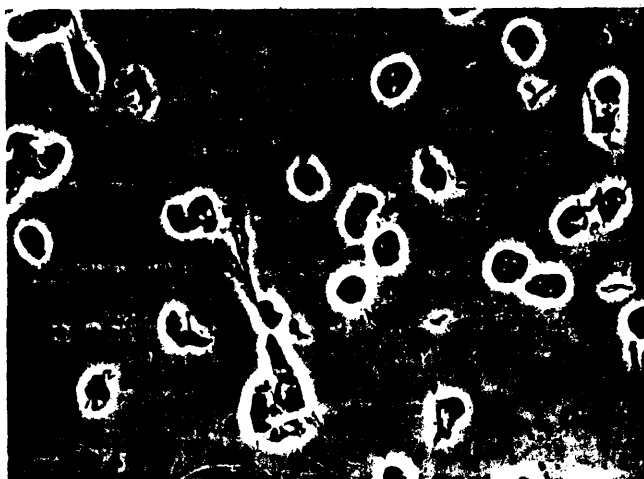
Lam. VI,.- Células suspendidas en el medio de aislamiento de wray.



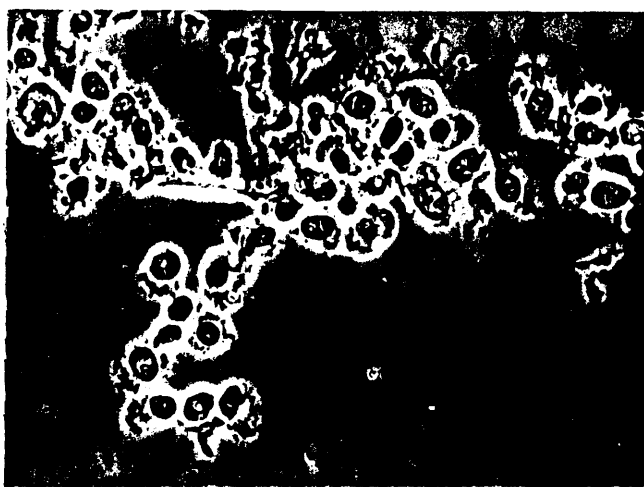
Lam. VII,.- Células suspendidas en el medio de aislamiento de Melero.



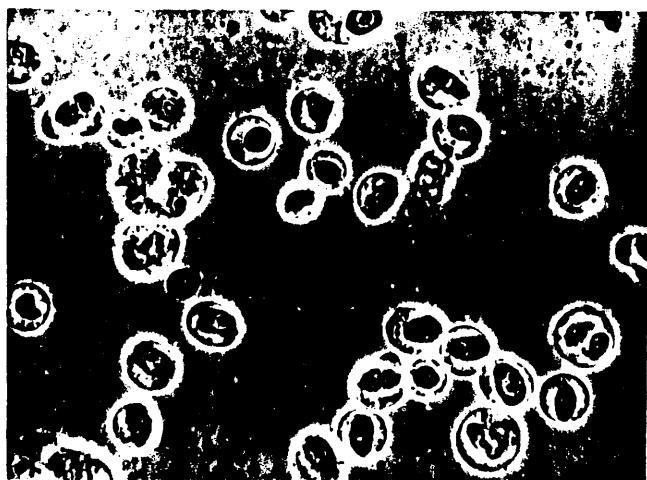
Lam. VIII.- Nucleos aislados por el método de Melero
antes de centrifugar.



Lam. IX.- Nucleos aislados por el método de Melero
despues de centrifugar.

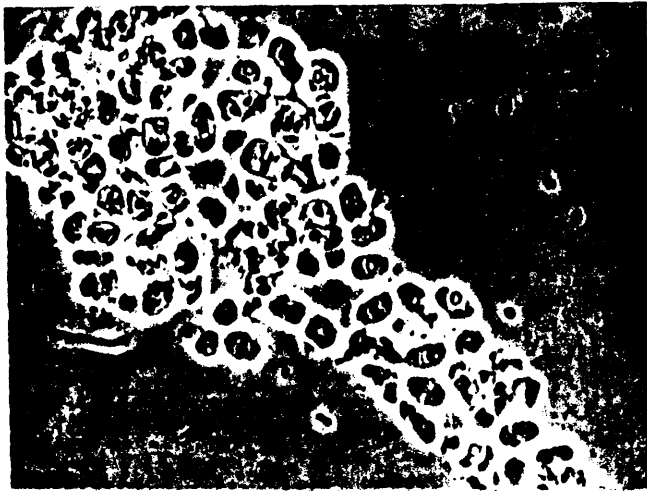


Lam. X .- Efecto mecánico (inyección) sobre las células suspendidas en medio de aislamiento (Wray).

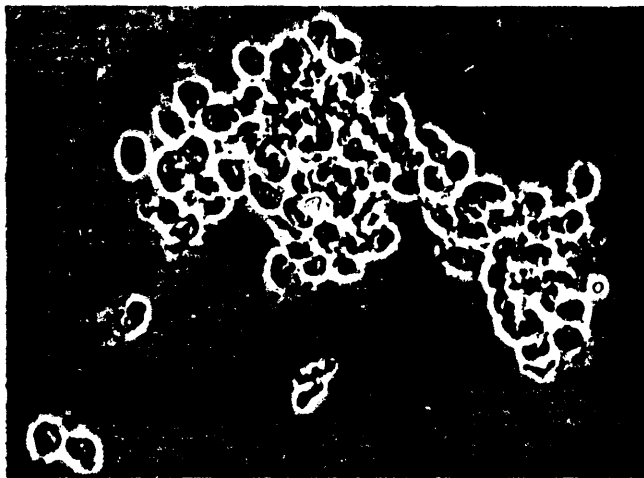


Lam. XI.-Efecto del detergente P-40(.1 %) sobre células suspendidas en medio de aislamiento (Wray).

"



Lam. XII.- Nucleos aislados con el medio de Wray
conteniendo detergente (P-40,1%) antes
de centrifugar ,despues del paso de in-
yección



Lam. XIII.- Nucleos aislados en el medio Wray +
P-40, despues de inyección y centrifu-
gación.

4.2.2. Pruebas con la 5'-nucleotidasa

Una vez comprobada la pureza de los núcleos por métodos microscópicos , investigamos si tenían contaminaciones citoplásmicas, para lo que utilizamos el test de la 5'-nucleotidasa.

Primero controlamos si los reactivos necesarios para que se efectue la reacción enzimática producían interferencias en la medida del P_i por el método de Baginski , viéndose que se formaba un sedimento y una película muy difícil de separar del resto del soluto ,lo que ocurría únicamente en las pruebas que contenían P_i , dándonos además resultados inconstantes , por lo que se utilizó el método de Parvin/Smith, que nos daba valores constantes y las interferencias eran prácticamente nulas.

Se midieron las actividades específicas en el homogenizado total de las células (suspensión celular), en la preparación nuclear y en el sobrenadante que se obtenía al sedimentar los núcleos por centrifugación que sería el resto citoplásmico.

TABLA II: Medida de la actividad de la 5'-nucleotidasa en fracciones subcelulares .

	Suspensión celular	Fracción citoplásmica	Núcleos aislados
Actividad específica $\text{nmol. } P_i . \text{mg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$	$125,3 \pm 5$	147 ± 26	0
Actividad total en %	100	96	0

Se calculò el valor medio y la desviaciòn standard de las actividades específicas de las partes indicadas anteriormente, en relación a la actividad enzimática de la suspensión celular según vemos en la tabla II.

Por medio de estas actividades podemos ver que mientras en los nucleos aislados no aparece ninguna actividad, en la fracción citoplásmica se encuentra prácticamente toda. La pérdida que se observa del 4% puede ser debida a las manipulaciones que hay que llevar a cabo hasta su medida.

4.2.3. Medida de fosfato por el método de Baginsky y col. (1967)

Como ya hemos indicado anteriormente, se obtuvieron interferencias al añadir la solución standard de P_i en este test. Así nos encontramos que al añadir el ATP en una concentración mayor a 5 mM, se obtenía una solución turbia que no se podía eliminar e interfería en la lectura colorimétrica. También se observó que al añadir los nucleos aislados en la solución de aislamiento se formaba un precipitado que no sedimentaba por centrifugación. Todos estos problemas nos hicieron prescindir de este método, apesar de ser más rápido.

4.2.4. Medida de la cantidad de proteína por el método Hartree y col.

Al hacer los experimentos con la proteína standard para comparar los resultados obtenidos por este método y los de Lorwy y col. (1951) vemos que la pendiente permanece constante en relación a la cantidad de proteína ya que se lleva a cabo una hidrólisis más completa de las proteínas insolubles importantes en nuestra reacción enzimática.

Además vimos que la variación de la pendiente al sustituir el agua por nuestra solución de aislamiento había un 20 % de reducción en la misma, pero se mantenía constante y no se observaban interferencias como se indica en la tabla III.

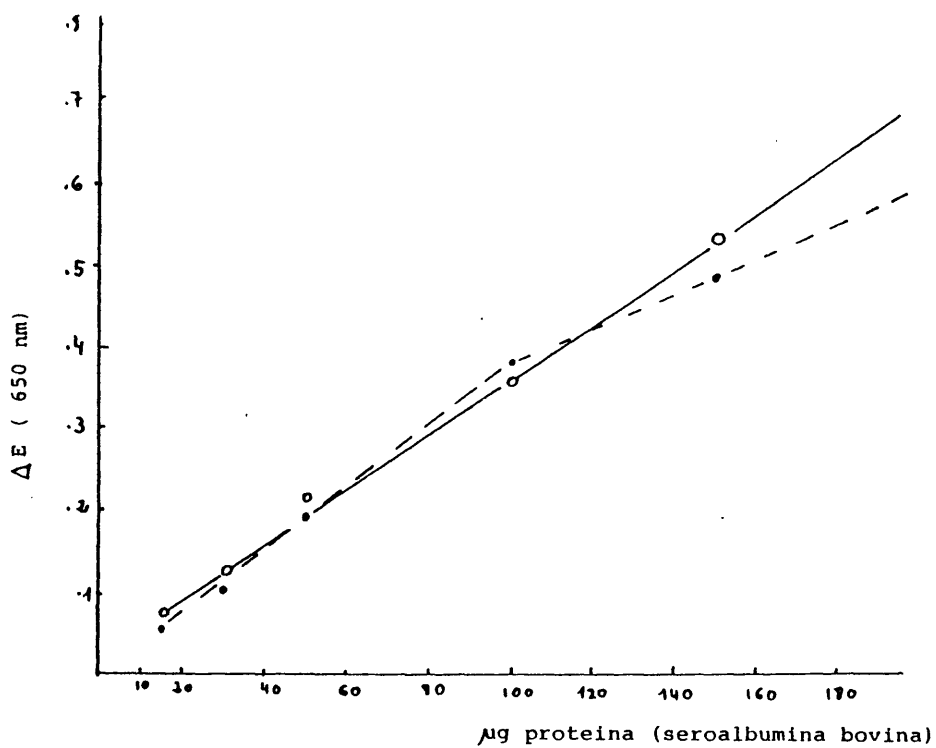


Fig. 1 .- Efectos comparativos entre la determinación proteínica utilizando los métodos de Hartree(o—o) y de Lorwy, et al. (●---●).

En la fig. 1 se recogen la medida de la proteína standard por los métodos de Hartree y Lorwy , pudiendose observar ,que mientras por el primer método se mantiene la linealidad hasta concentraciones altas, por Lorwy la pendiente no se mantiene constante sobre todo en concen-

traciones apartir de los 100ug de proteina.

TABLA III : Efecto de la soluci3n de aislamiento en la determinaci3n de proteina con el m3todo de Hartree.

Albumina (1mg/ml)	Valor medio de la pendiente (a)	%
1 ml de H ₂ O	3.06 \pm 0.2	100
0,1 ml (s. aisl.).	2.43 \pm 0,2	80

Estos c3culos se hicieron aplicando la regresi3n lineal.

4.2.5. Medida de fosfato por el m3todo de Parvin/Smith :

En primer lugar se hicieron como en casos anteriores los controles para determinar las posibles perturbaciones que podian existir en las lecturas colorim3tricas. Empezamos por el fosfato standard , en donde las concentraciones de 3ste eran semejantes a las que se obtenian en el test ATPasico (5, 10, 20, 30 nmol en 1,5 ml P₁-volumen muestra), con estas medidas construimos la linea cuya pendiente iba a ser la referencia para el resto de los experimentos o controles (en caso de estos se tomaron siempre las m3ximas concentraciones que ibamos a tener el medio de reacci3n).

- 1) Temperatura . Como ya aclaramos en m3todos esta se mantuvo constante a 5^o C , pu3s un cambio en la temperatura afectaba a los reactivos manifestandose en el valor de la pendiente al medir la soluci3n standard de P₁ .

- 2) Tiempo , sobre todo en las medidas espectrofotométricas (entre muestra y muestra) se tenía que mantener constante.
- 3) Solución de aislamiento . Se ve un aumento en la absorción al medir el P_i en presencia del medio en el que aislamos nucleos y para eliminar este efecto , mantenemos su concentración lo más diluida y constante en los experimentos realizados
- 4) Proteína . Cuando se aumentó la concentración de la proteína en el test (0 a 270 $\mu\text{g/ml}$) se vé una variación en la pendiente standard obteniéndose una pérdida de un 15% para una concentración de 270 $\mu\text{g/ml}$ con respecto a concentraciones bajas. En nuestros experimentos no utilizamos generalmente estas concentraciones tan grandes , a escepción de los controles de la actividad ATPasica , al querer definir los límites de concentración proteínica en función de la actividad enzimática. Normalmente en nuestros experimentos trabajamos en un intervalo entre 15 a 50 $\mu\text{g/ml}$, a lo que tenemos que unir la dilución que tiene lugar al añadir el resto de los componentes de la reacción. Con todo esto la pérdida de pendiente en relación al patrón es del 3 a 5%.
- 5) El tampón Tris-HCl (0 -150 mM) utilizado en nuestros experimentos produce incluso en las concentraciones máximas una disminución de la pendiente de un 8 % como máximo.
- 6) El ATP así como las sales de calcio , magnesio o EDTA no parecen influenciar en las concentraciones máximas utilizadas en nuestros experimentos.

Una vez realizados estos controles sobre posibles interferencias de los componentes de la reacción enzimática ATPasica y después de obtenida la curva patrón , referencia necesaria para los calculos posteriores , se procedió a la medida de la actividad nuclear ATPsica.

4.3. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LOS NUCLEOS AISLADOS

4.3.1. Determinación ATPasica :

En trabajos anteriores ya publicados (Nievergelt 1976) se habían determinado los efectos de la tripsina sobre su actividad, viéndose que ésta permanecía constante en un intervalo entre 5 minutos y 2 horas , fuera de cuyo tiempo se obtiene una pérdida de estas enzimas situadas en la membrana.

Al utilizar EDTA o métodos mecánicos para separar las células de la superficie de crecimiento , si bien la actividad enzimática no se alteraba mucho (se obtenía un 10 % más que por medio de tripsina) las células permanecían pegadas a la superficie cristalina y al intentar separarlas o bien era prácticamente imposible de una manera suave o se rompían al intensificar el tratamiento, esto traía consigo dificultades posteriormente al aislar los nucleos.

1) Actividad básica : La definimos como la actividad ATPasica obtenida al medirla bajo las condiciones dadas de temperatura, pH y demás componentes de la reacción enzimática con excepción de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Esto se hizo para controlar los distintos compuestos de ATP que podrían contener impurezas de iones metálicos que acompañasen . Para eliminar estas oscilaciones primero se controlaron añadiendo distintas concentraciones de EDTA , con lo que obtuvimos que para una concentración de 1 mM la actividad básica se mantenía constante independiente del origen del ATP . Su valor fue de 0,2 $\mu\text{mol de } P_i \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

2) Concentraciones de CaCl_2 y MgCl_2 : La concentración máxima de la sal de calcio fue de 5 mM para medir Ca-ATPasas , observándose también

que si la concentraci3n era mayor de 6 mM se formaba un precipitado de fosfato c3lcico (soluble por 3cidos), dependiente del tiempo de incubaci3n y la concentraci3n de proteina .

En el caso de la ATPasa estimulada por magnesio el m3ximo se obtenia cuando la concentraci3n de cloruro magn3sico era de 2 mM.

- 3) El pH tambi3n fue determinado , encontrandose que para 8.0 se obtenia el m3ximo de actividad enzim3tica , pero para mantener la consistencia de la membrana se experiment3 con un pH de 7.5 a 37°C. Se utiliz3 Tris/HCl ya que su pK quedaba dentro de estas oscilaciones.
- 4) ATP: El m3ximo P_i formado dependiente de la concentraci3n de ATP en la reacci3n enzim3tica se obtuvo con 3 mM de ATP si mediamos las ATPasas estimuladas por calcio y de 1.5 mM en las estimuladas por magnesio. (Para hacer estos experimentos se tomaron cantidades menores del incubado (0.1 ml), con lo que no sobrepasabamos el m3ximo permitido de ATP en la determinaci3n del fosfato (interferencias))
- 5) Proteina: Se control3 la dependencia de la actividad enzim3tica especifca y la concentraci3n de proteina en un intervalo de 30-210 $\mu\text{g/ml}$, encontrandose que la p3rdida relativa al aumentar la concentraci3n de 3sta era de un 55% en las estimuladas por calcio, y de un 67 % en las Mg-ATPasas (el 100% estaba para 50 $\mu\text{g/ml}$). Parte de esta p3rdida era debido a las interferencias del test de P_i .
- 6) Temperatura: Se midi3 la actividad enzim3tica a las temperaturas de 22°C y 37°C , que son los valores en que las c3lulas con que trabajamos realizan sus funciones . Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV dada a continuaci3n.

Por medio de estos controles se caracterizaron las enzimas para los trabajos que se iban a llevar a cabo , pero con las ATPasas nucleares , que son con las que experimentaremos.

TABLA IV : Efecto de la temperatura sobre la actividad ATPasica.

Actividad enz. específica $\mu\text{mol P}_i \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (homogenizado)	Condiciones de estimulación	Temperatura de incubación		Pérdida de actividad 37°C- 22°C
		37°C	22°C	
	Ca-ATPasa	1.18 \pm .17	0.24	-80
	Mg-ATPasa	1.68 \pm .15	0.34	-70

4.3.2. Actividad enzimática de ATPasas nucleares:

En primer lugar se midió la relación en que se encontraban las actividades específicas de las ATPasas nucleares (dependiente de Ca^{2+} de Mg^{2+}) con las de suspensión total y la fracción citoplásmica que quedaba al aislar los nucleos.

TABLA V : Actividad enzimática en nucleos aislados y su distribución en otras fracciones.

Actividad enz. específica	Condiciones de estimulación	Suspensión total $\mu\text{mol P}_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	Nucleos aislados %	Fr. citoplásmica %
	Ca-ATPasas	1.2 \pm .2	110 \pm 19	71 \pm 11
	Mg-ATPasas	1.7 \pm .2	142 \pm 13	62 \pm 14
Relación	Ca/ Mg	1.0	0.8	1.2
Actividad enz.	Ca^{2+}		33	62
total(100Z=susp)	Mg^{2+}		30	53

En cuanto a la pérdida de la actividad debido a las manipulaciones llevadas a cabo hasta aislar los nucleos , fueron en el caso de las estimuladas por calcio de un 5% y en el caso de magnesio de un 17%.

En la tabla V vemos que la actividad ATPasica más grande se encuentra en los nucleos aislados (específica), mientras que en la actividad total aparece algo mas marcada en las Ca-ATPasas que en Mg-ATPasa, resultando en ambos casos aproximadamente un tercio de la actividad total.

1) Efecto de la Oligomicina : Estos experimentos se realizaron en presencia de oligomicina para poner claro si en los nucleos aislados se encontraban ATPasas sensibles a esta (¿contaminaciones citoplásmicas, retículo endoplasmático ?), pero como se ve en la tabla VI no se encuentran apenas diferencias entre las actividades enzimáticas con o sin oligomicina , tanto en la ATPasa estimulada por calcio como por magnesio. La concentración de esta fue 4 ug/ml y los resultados se dan en % en relación a controles.

TABLA VI : Inhibición de la actividad ATPasica por Oligomicina.

	Suspensión total	Nucleos aislados	Fracción citoplásmica
Ca-ATPasas	11 \pm 13	10 \pm 13	4 \pm 13
Mg-ATPasas	7 \pm 8	2 \pm 10	10 \pm 9

Lo que también podemos observar en esta tabla es la gran desviación obtenida en los resultados

4.4. EFECTOS DE LAS IRRADIACIONES SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasica

4.4.1. Irrradiación total (1000 rad) de las células :

Las células se suspendieron en 170 mM NaCl como ya se indicaba en métodos y se irradiaron procediéndose después al aislamiento de los núcleos seguido todo de la medida de la actividad enzimática . Los resultados obtenidos se recogen en la tabla VII dada a continuación.

TABLA VII : Actividad ATPasica en controles y células irradiadas con rayos X (1000 rad).

Actividad enz. $\mu\text{mol P}_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	Suspensión total		Núcleos aislados	
	Ca-ATPasa	Mg-ATPasa	Ca-ATPasa	Mg-ATPasa
Controles	$1.3 \pm .3$	$2.2 \pm .4$	$1.4 \pm .3$	$2.5 \pm .2$
Irradiados	$0.9 \pm .2$	$2.2 \pm .4$	$1.1 \pm .5$	$2.4 \pm .5$
Reparto de la actividad enz.(%)	----	----	32.3 ± 4	32.5 ± 3.7
Actv. permanente en irr/controles (%)	69	100	79	96

Vemos pues que hay una pérdida de la actividad enzimática dependiente de calcio , mientras que la dependiente de magnesio permanece más o menos inalterada , no variando mucho cuando procede de los núcleos aislados .

Estos valores lo mismo que los que siguen se realizaron sacando los valores medios de seis experimentos.

4.4.2. Irrradiación de los núcleos aislados (1000rad) en el medio de aislamiento:

Los núcleos después de aislados se irradiaron en la solución en que se habían aislado , midiéndose la actividad ATPasica inmediatamente. Los resultados aparecen en la tabla VIII que sigue.

TABLA VIII : Actividad ATPasica en núcleos aislados (controles e irradiados , 1000rad).

Actividad enz. especifica	Ca-ATPasa $\mu\text{mol P}_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	Mg-ATPasa $\mu\text{mol P}_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
Controles	1.0 \pm .2	2.1 \pm .2
Irradiados	.9 \pm .1	2.1 \pm .1
Actividad relativa despues de irradiar(%)	90	100

Como podemos observar al medir la actividad ATPasica inmediatamente después de irradiar se obtenía una pequeña pérdida de la estimulada por calcio , pero la estimulada por magnesio permanecía practicamente constante . No hay que olvidar que durante el tiempo de irradiación los controles estuvieron en un baño de agua a la misma temperatura y condiciones que los que se irradiaron.

4.4.3. Comparación de la actividad ATPasica en núcleos aislados, procedentes de células o de nucleos aislados e irradiados (1000 rad)

Se compararon los resultados obtenidos al irradiar las células

completas en una solución de NaCl 170 mM , seguido del inmediato aislamiento de los nucleos para determinar su actividad enzimática y la obtenida cuando después de aislar los nucleos se irradiaron , para su posterior medida de la actividad ATPasica (los nucleos se irradiaron en el medio de aislamiento para su mejor estabilización).

Los resultados se encuentran en la tabla IX

TABLA IX : Actividad ATPasica de núcleos aislados e irradiados y en núcleos procedentes de células irradiadas.

Actividad enz. específica $\mu\text{mol P}_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	Núcleos aislados de células irradi. en NaCl		Núcleos aislados e irradi. en solución de aislamiento	
	Ca-ATPasas	Mg-ATPasa	Ca-ATPasa	Mg-ATPasa
Controles	1.4	2.5	1.0	2.1
Irradiados	1.1	2.4	0.9	2.1
Relación en % irradiad/ control	79	96	90	100

Estos resultados nos indican un claro efecto por acción de la radiación , cuando se irradian las células completas y después se aíslan los núcleos para medir su actividad ATPasica , siendo este efecto más patente en la que está estimulada por calcio.

4.5. MEDIDA DE LAS VARIACIONES DEL VOLUMEN NUCLEAR

4.5.1. Variaciones del volumen nuclear:

Las curvas de distribución que vemos en las fotografías (figuras) que siguen, provienen de núcleos aislados, los cuales se mantuvieron en los mismos medios de incubación que para la reacción ATPasica (estimulada por calcio) y hexoquinasa introduciendo algunas variables (ver métodos).

Otro punto a tener en cuenta es que aunque no se varió la solución de aislamiento de los núcleos en estos experimentos, se obtienen algunas diferencias en la manera en que éstos se comportan, variando la distribución del volumen nuclear de una a otra experiencia, por esto sólo se comparan las fotografías que corresponden a distintos efectos pero donde los núcleos se aislaron en un experimento y no las procedentes de 2 ó 3 aislamientos nucleares independientes.

En las fotografías que obtenemos de la computadora, comparamos no solo las dos curvas que aparecen en una figura sino la de diferentes fotografías del mismo experimento ("puffer A y B").

4.5.2. Efecto de calcio :

En este caso tenemos que distinguir cuando no hay ATP en el medio ATPasico y cuando lo hay :

- 1) Sin ATP en el medio de incubación , se observó que al añadir CaCl_2 se producía un aumento en el tamaño de los núcleos (fig.5)

En la fig.5 se vió un aumento claro del volumen, al aumentar la concentración de calcio de 1 mM ("puffer B") a 5 mM ("puffer A")

- 2) Con ATP . Cuando el ATP se encontraba presente en la solución

de incubación ATPasica se obtiene un efecto semejante (fig.6,7,8) al observado anteriormente, es decir encontramos que al aumentar la concentración de CaCl_2 se observa un aumento de volumen.

Fig.6 Las concentraciones de CaCl_2 fueron 1 mM "puffer A" y 5 mM en "puffer B" claro aumento del volumen nuclear.

Fig.7 Las concentraciones de CaCl_2 fueron: "puffer A" 5 mM, "B" 2 mM

Fig.8. Concentraciones de CaCl_2 fueron: "puffer A" 2 mM, "B" 10 mM.

Las comparaciones de los efectos que tienen las variaciones de la concentración de CaCl_2 en presencia o ausencia de ATP las tenemos en la figura 9.

Fig. 9 .Observamos que el volumen nuclear medio es mayor si la concentración de calcio es de 0.3 mM en ausencia de ATP("puffer A"), que cuando la concentración de esta sal es de 2 mM en presencia de ATP en el medio ("puffer B").

4.5.3. Efecto de EGTA . Como estábamos interesados en ver como se iban a comportar los nucleos en total ausencia de calcio y en la solución de aislamiento siempre hay CaCl_2 (ver métodos), se intento complejar esta sal con EGTA, "substrayendose" así el calcio del medio . El resultado de este complejamiento se presenta en la figura 10, donde se observó que al añadir el complejante se produce una reducción del volumen nuclear de parte de la población y de destrucción de otra parte.

Fig. 10. En el "puffer A" los nucleos se encuentran en un medio carente de ATP, sin posterior adición de CaCl_2 , es decir que su concentración fue de 0.3 mM sin EGTA. En el "puffer B" las condiciones de ATP y calcio son las mismas que en A pero se ha añadido EGTA al medio con una concentración de 1 mM. Las gráficas nos

nos muestran una clara disminución del volumen en parte de la población y en otra una destrucción de la población (disolución de la membrana nuclear?) . Otro indicio que nos confirma la rotura de una parte viene dado por el tiempo que se tardó en contar la población en el puffer A (35 segundos), mientras que en el B donde se encontraba el EGTA fue de 65 segundos . Como sabemos que el tiempo utilizado para el recuento de poblaciones , con el mismo número de partículas se mantiene aproximadamente constante, sino se han producido ninguna rotura, podemos decir que en esta población se han producido cambios en ella dando lugar a rotura de membranas y pérdida de volumen.

.5.4. Efecto de ATP. Con los experimentos que siguen se intentó aclarar el efecto del ATP sobre el volumen nuclear y al mismo tiempo ver si influía sobre las variaciones que hemos observado al añadir CaCl_2 o variar la concentración de esta sal.

Cuando los núcleos se encontraban en una solución donde la concentración de calcio es mínima , como es en la solución de aislamiento (0.3 mM) y añadimos ATP (concentración final 1.7 mM) observamos una destrucción de la población grande (incluso mayor que la obtenida al añadir EGTA) . La suspensión nuclear se hizo transparente apareciendo al tiempo un "precipitado", que al observarlo al microscopio aparecía estar formado no por núcleos pegados , sino material nuclear sin membranas enteras de separación . El tiempo como indicamos en el apartado(3) , también marcaba una clara diferencia entre el utilizado para medir la población en puffer A (21 segundos)y en B (153 seg.) .

Figura 11. En esta se ven los efectos del ATP cuando la concentración de calcio es mínima 0.3 mM. Puffer A =-ATP , B= + ATP (1.7 mM)

Posteriormente se incrementó la concentración de CaCl_2 de 1-5 mM con o sin ATP. Se observó que al aumentar la concentración de calcio en el medio que contenía ATP, el aumento experimentado por los nucleos era menor, respecto al que tenía lugar cuando en la solución no había ATP (fig. 12 , 13).

Debido a que antes de la medida del volumen nuclear se añadía la solución hexoquinasa (ver métodos) , podría atribuirse este fenómeno de distinto aumento de volumen para igual concentración de calcio , no solamente a la presencia de ATP exclusivamente , sino al acoplamiento de éste con la hexoquinasa , por lo que repetimos el experimento pero eliminando la hexoquinasa . Como se vé en la fig. 14 , el volumen de los nucleos sin ATP es mayor que en donde el ATP está presente.

Figura 12 : Con la misma concentración de calcio (5 mM) se ve que la curva correspondiente a la población contada en puffer "A" , donde se había añadido ATP (1.7 mM) , muestra un volumen menor que la correspondiente al "puffer B" carente de ATP .

Figura 13 : Se repitió el experimento marcado en fi. 12 , pero la concentración de CaCl_2 fue de 1 mM , donde se ven los mismos resultados (menor aumento de volumen + ATP) .

Figura 14 : En ésta se comparan los efectos de ATP cuando no hay "tratamiento hexoquinasa" . En la curva representante de la población contenida en puffer A se añadió ATP (1.7 mM) siendo la concentración de calcio 1 mM , en el puffer B bajo las mismas condiciones de calcio y hexoquinasa se señala la variación de volumen de la misma población pero sin ATP , viendose claramente semejante resultado que cuando los nucleos se han incubado en medio hexoquinasa.

4.5.5. Efecto del tampón en que se diluyeron los nucleos:

Si suponemos que las ATPasas nucleares se van a comportar como las mitocondriales, en parte confirmado por nuestros experimentos, esperamos encontrar una variación del volumen nuclear en función del pH del tampón.

Como se ve en la figura 15 hay una disminución del volumen al acidificar el tampón. Vemos pues que siendo la concentración de CaCl_2 0.3 mM y en presencia de ATP, cuando el tampón tiene un pH de 7.6 su volumen es mayor que cuando es 7.2.

Figura 15. En el puffer A los nucleos estaban en un medio con una concentración de 0.3 mM de calcio, 1.7 mM de ATP y el tampón fue Imidazol/ HCl pH 7.2. En "B" se mantiene todo constante a excepción del tampón que era Tris/ HCl pH 7.6 (el mismo que el utilizado para la reacción ATPasica), siendo la concentración de ambos tampones de 40 mM, siendo el tiempo "Clock" de 19" ("A"), mientras en "B" es 153".

4.5.6. Influencia de la "solución de incubación hexoquinasa" :

Estos experimentos como ya se describieron (ver métodos), se realizaron después de mantener los nucleos en el medio de incubación ATPasico, pudiendo tener efectos sobre el volumen nuclear. Lo primero que teníamos que controlar era la influencia de la disminución de la concentración de los componentes de la incubación ATPasica (1,4 x) por dilución debido al segundo "tratamiento".

1) Dilución del calcio. Como habíamos comprobado anteriormente que el aumento en la concentración de calcio significaba un aumento en el volumen nuclear, es decir que su disminución tenía que significar una reducción en el tamaño de los nucleos. Este efecto se ve en la fig. 16 y se pone mucho más de manifiesto en la fig. 17 en donde

no hay ATP. Así pues vemos que después de "tratar" los núcleos con ATP la influencia del "medio hexoquinasa" sobre el volumen nuclear es más pequeña, apesar de la disminución de la concentración de CaCl_2 por dilución.

Figura 16. En la población medida en A los núcleos después de tratados con ATP (1.7 mM) y con una concentración de calcio de 1 mM, fueron diluidos con medio hexoquinasa (la concentración de calcio disminuye de 1 mM a 0.71 mM). En B se recogen la población de núcleos en las mismas condiciones que A pero sin posterior dilución (CaCl_2 se mantiene 1 mM)

Figura 17. Los pasos realizados con estos núcleos fue como en fig. 16, pero sin tratar con ATP.

- 2) Efecto del tiempo de incubación. Debido a las distintas manipulaciones que teníamos que hacer, sobre todo al irradiar, se controló si alargando el tiempo de incubación en el medio hexoquinasa de los núcleos iba dar una variación del volumen de éstos, con la correspondiente alteración de los resultados en los experimentos posteriores.

Figura 18. Los núcleos después de tratados (+ ATP) y suspendidos en medio hexoquinasa se mantuvieron 30 minutos (puffer A) y 10 min. (puffer B) en medio hexoquinasa no apareciendo diferencias en las gráficas representativas. Con esto se confirma que el tiempo elegido era lo suficientemente largo o se había alcanzado ya el estado estacionario.

- 3) Acción de la glucosa. Entre los componentes de la solución hexoquinasa se encuentra la glucosa, no pudiendo ignorarse que ésta puede ejercer un efecto osmótico sobre el volumen nuclear. Según esto variaríamos la concentración de esta de 0 a 100 mM en la solución hexoquinasa para así poder recoger, en caso de que existiese, unos

resultados claros (fig.19).

Figura 19. La suspensión nuclear después de incubar en una concentración de calcio de 1mM , fueron resuspendidos en solución hexoquinasa carente de glucosa ("A") o con una concentración de 100 mM ("B") de ésta. Como se recoge en las curvas no se ve una variación de la distribución del volumen nuclear por acción de la glucosa, (en ambas poblaciones no se había añadido ATP).

- 4) Posterior adición de calcio . Por medio de la posterior adición de calcio a los núcleos "tratados" queríamos obtener unos resultados que ayudarían a explicar el efecto de dilución ya observado en experimentos anteriores . Por esto añadimos en el medio hexoquinasa CaCl_2 hasta duplicar su concentración final, observándose que no hay ninguna variación en la medida del volumen nuclear (fig. 20).
Figura 20 . La suspensión nuclear después de incubar en medio ATP-ásico con ATP (1.7 mM) y CaCl_2 (1 mM) , se diluyeron con solución hexoquinasa que contenía calcio hasta una concentración de 2 mM ("B") o carente de esta sal ("A") se incubaron y midieron.

4.5.7. Acción de los rayos X (1000 rad) sobre el volumen nuclear:

Apoyándonos en la hipótesis de Mitchell según la cual la reacción ATPásica está unida a la formación de un gradiente de pH y de un campo eléctrico con una diferencia del potencial de la membrana mitocondrial , suponemos que la energía inducida por los rayos X y depositada en el campo eléctrico de la membrana, trae consigo la descarga parcial de ésta , dando paso al calcio , lo que podríamos medir por variaciones en el volumen nuclear, siempre que el gradiente de Ca^{2+} fuera distinto del equilibrio.

Necesitábamos además para ver este efecto, el eliminar el ATP

sobranste al final de la reacción ATPasica , lo que hacíamos con la hexoquinasa , cuya presencia es necesaria, pues de otro modo la descarga producida por los rayos X sería rápidamente " neutralizada"y no se podrían observar posteriormente variaciones en el volumen.

En los experimentos hechos a continuación en donde se irradiaron la suspensión nuclear después de haberse incubado en medio ATPasico y medio hexoquinasa, no se encuentran variaciones del volumen nuclear de núcleos irradiados respecto a controles (no irradiados), independiente de que las concentraciones de calcio en el medio ATPasico fueran distintas (fig. 21, 22, 23).

----Figura 21. Los núcleos después de "tratados" (+ ATP 1.7 mM) en una solución conteniendo 5 mM CaCl_2 , se incubaron en solución hexoquinasa (concentración final de calcio 3.6 mM) y se irradiaron ("A") o permanecieron como controles sin irradiar ("B").

----Figura 22. Las condiciones a que se sometieron los núcleos fueron las mismas que en fig. 21 , a excepción que la concentración de calcio en el medio ATPasico fue de 1 mM y al final de 0.7 por dilución del medio hexoquinasa.

----Figura 23. Iguales condiciones que en 21 y 22 , pero la concentración de calcio varió de 2 mM a 1.4 mM.

- 2) Posterior adición de calcio . Debido a estos resultados obtenidos en experimentos anteriores , se incrementó la cantidad de CaCl_2 por adición posterior en el medio hexoquinasa, con esto intentabamos restablecer el campo eléctrico postulado mediante la restauración de un gradiente de calcio , que suponíamos había desaparecido por el efecto de dilución que había tenido lugar con el medio hexoquinasa carente de CaCl_2 .

Los resultados obtenidos variaron en relación a la cantidad de calcio presente en el medio hexoquinasa . De tal forma que para un aumento de 1 mM a 1.4mM encontrabamos una disminuciòn del volumen en los nucleos irradiados respecto a los controles(fig.25). Cuando el aumento fue de 1 mM a 2.2 mM el volumen de los nucleos irradiados era mayor que el de los controles (fig.24).

Figura 24. Los nucleos despues de incubados en medio ATPasico (+ ATP 1.7 mM) donde la concentraciòn de calcio era de 1 mM , se incubaron en medio hexoquinasa que contenia CaCl_2 hasta una concentraciòn final de 2.2 mM , a continuaciòn unos se irradiaron ("A")y otros se dejaron como controles ("B"), procediendose inmediatamente a su medida.

Figura 25 . En este caso los tratamientos a que se sometidò a la soluciòn nuclear fueron los mismos que en la fig.24, a escepciòn que la adiciòn de calcio en la soluciòn hexoquinasa fue hasta una concentraciòn de 1.4 mM.En la gràfica representante de la poblaciòn contenida en el puffer A,tenemos los nucleos irradiados y en B los controles.

- 3) Efecto del tiempo que estuvieron los nucleos irradiados en la soluciòn NaCl hasta su medida . Como tambien teniamos que tener en cuenta posibles efectos de la soluciòn salina donde mediamos el volumen ,sobre los nucleos irradiados , hicimos un experimento en donde se median los nucleos inmediatamente y los comparamos con aquellos que se hablan medido despues de estar dos minutos en suspensiòn , obteniendose un diferencia mínima que se recoge en fig.26
- Figura 26. La soluciòn nuclear despues de incubar en los medios ATPasico y hexoquinasa, siendo la concentraciòn final de calcio de 2.2 mM se irradiaron y se dejaron en la solucion de NaCl 153 mM 2 min. ("B") ò se midieron inmediatamente(" A ").

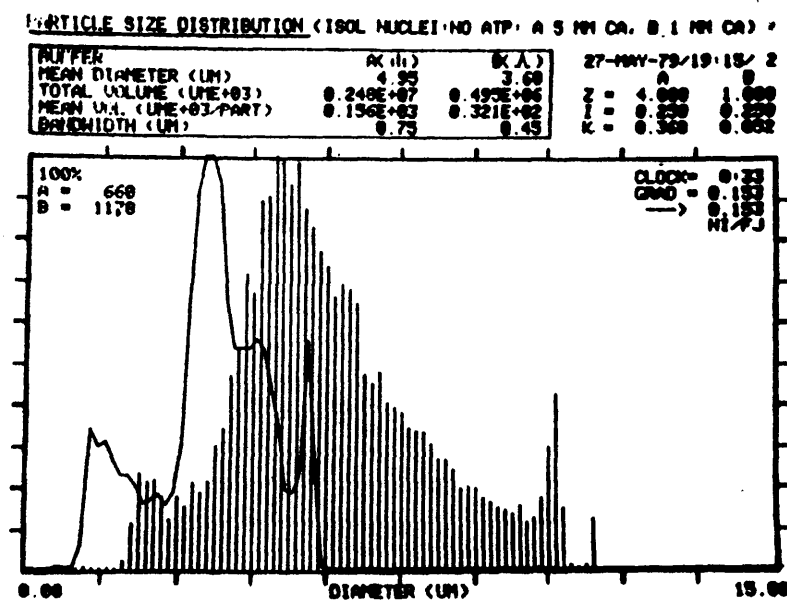


Fig. 5 .- Efecto de distintas concentraciones de CaCl_2 sobre el volumen nuclear en ausencia de ATP.

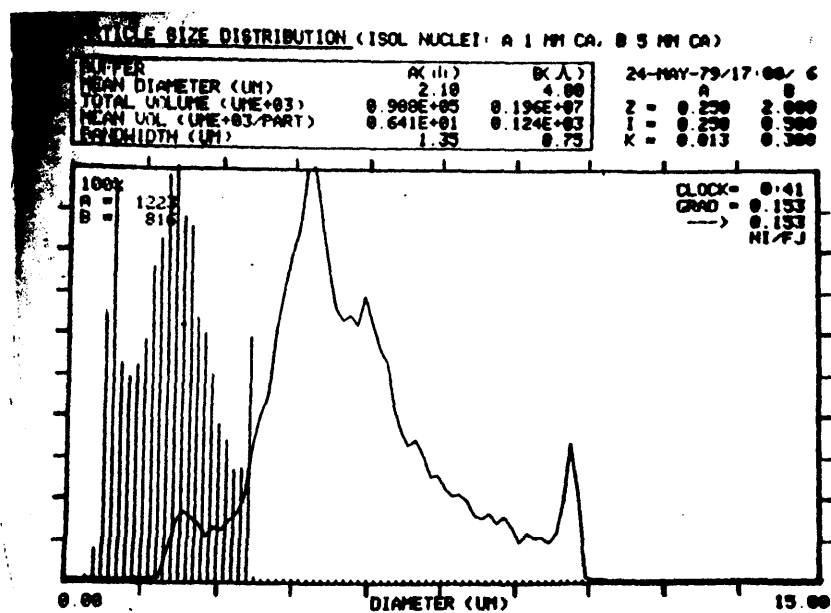


Fig. 5 .-Efecto de distintas concentraciones de CaCl_2 (1 mM y 5 mM) en presencia de ATP.

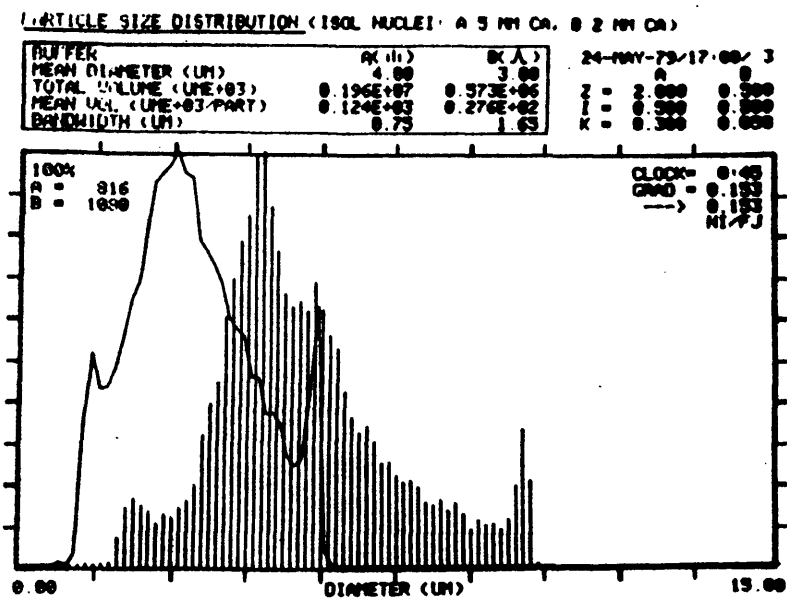


Fig. 7 .- Efecto de CaCl_2 (5 mM y 2 mM) sobre el volumen nuclear en presencia de ATP.

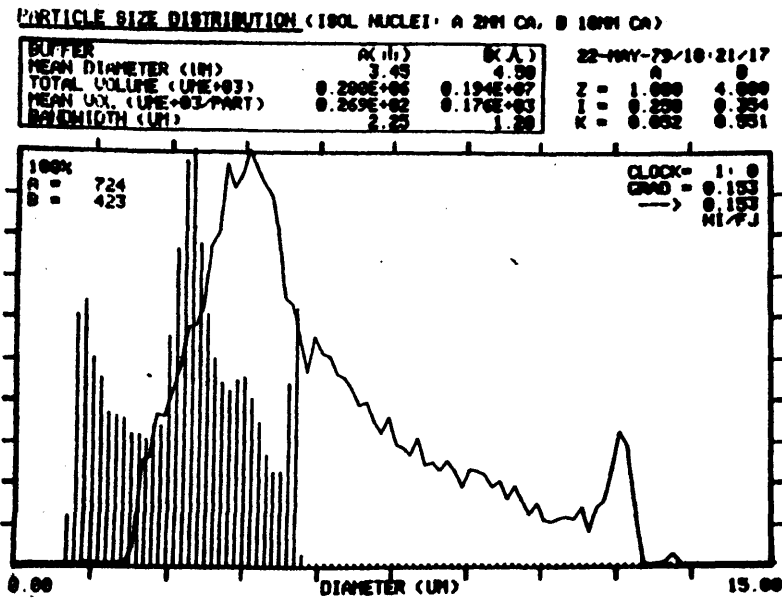


Fig. 8.- Efecto de CaCl_2 (2 mM y 10 mM) en presencia de ATP.

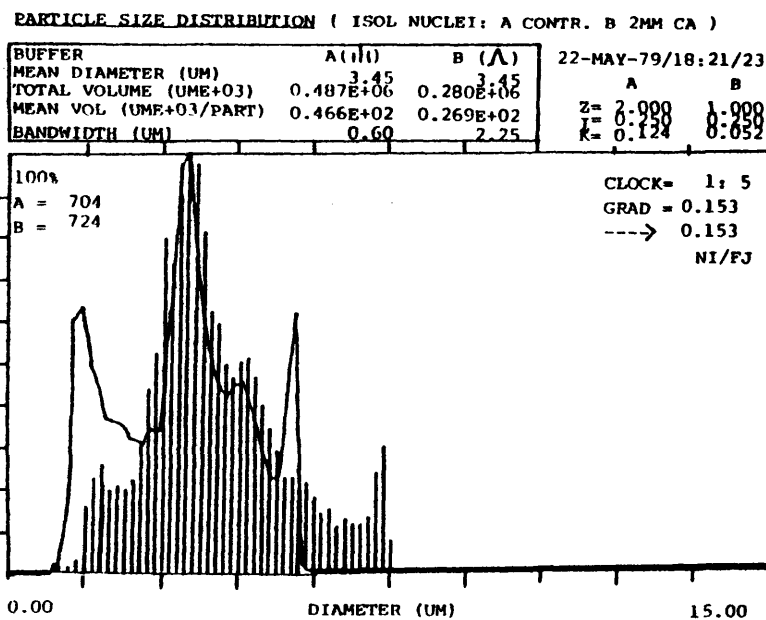


Fig. 9 .- Comparaciones de los efectos debidos a distintas concentraciones de CaCl_2 (.3 mM y 2 mM) en presencia y ausencia de ATP.

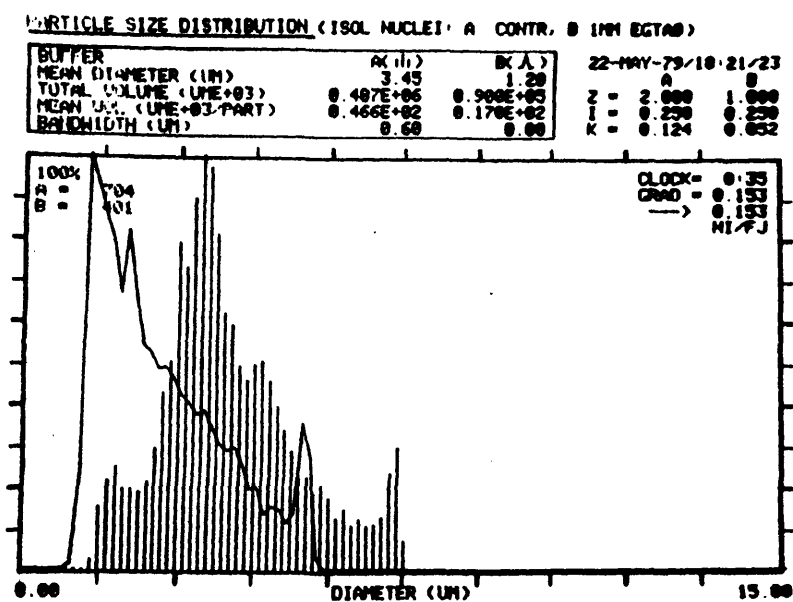


Fig. 10.- Efecto de EGTA(1mM) en presencia de CaCl_2 (.3 mM)
o resultado del Δ complejamiento del calcio.

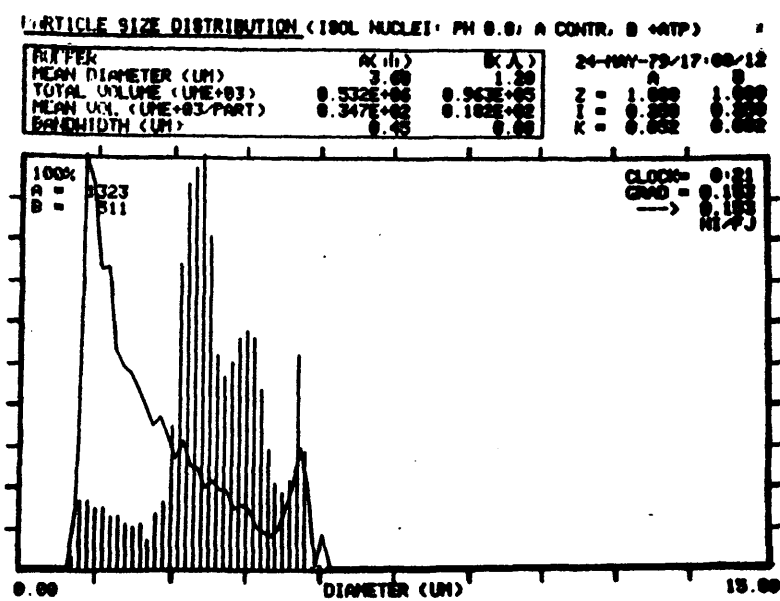


Fig. 11.- Efecto del ATP (\pm) sobre el volumen nuclear , siendo la concentración del calcio de 0.3 mM.

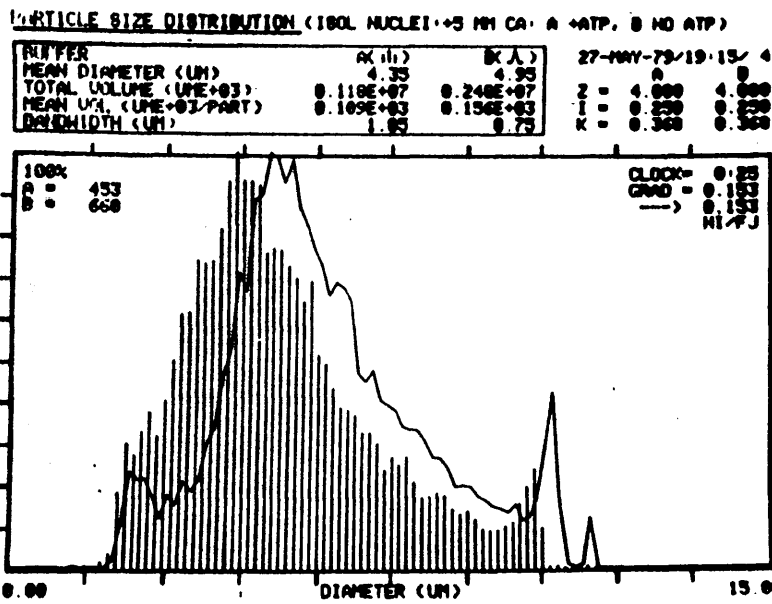


Fig. 12 .- Efecto del ATP⁽⁺⁾ cuando la concentración de CaCl₂ es de 5 mM.

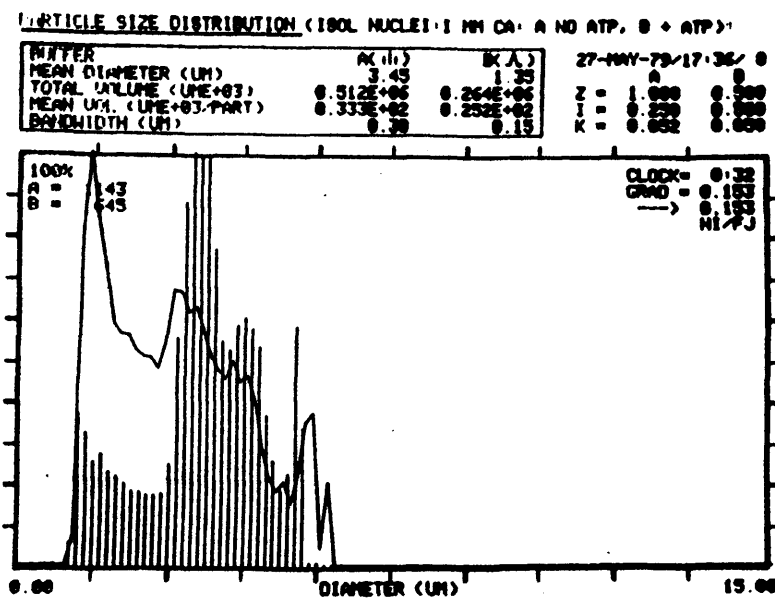


Fig. 13 .- Variación del volumen nuclear debido a la presencia o ausencia de ATP , seguido de su incubación en "medio hexoquinasa".

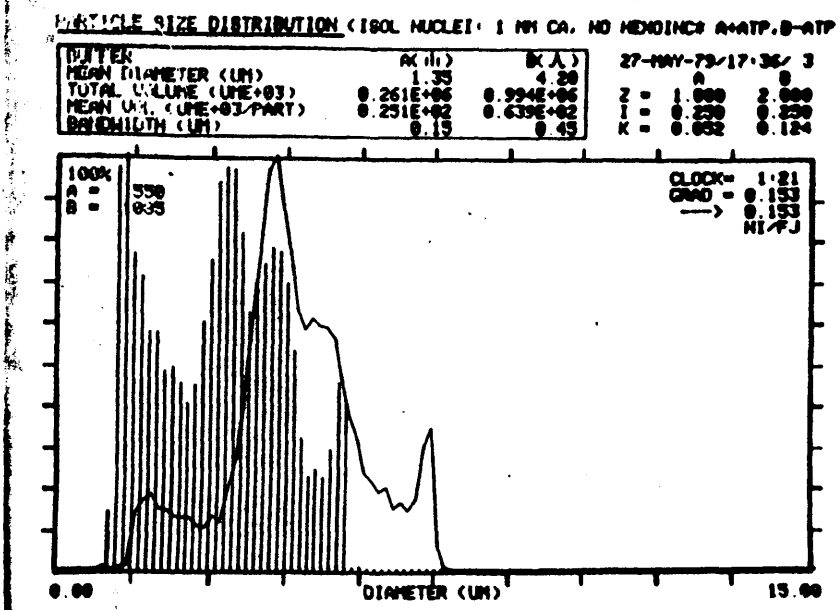


Fig. 14 .- Variacion del volumen nuclear cuando despues de ($\frac{+}{-}$) ATP "tratamiento " , no se incubaron en el " medio hexoquinasa".

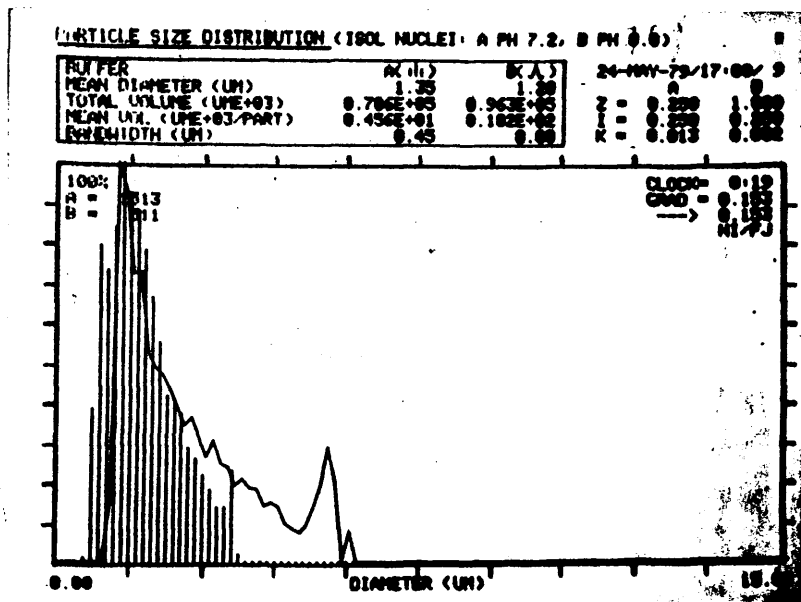


Fig. 15 .- Efecto del tampón . (las condiciones de incubación fueron: .3 mM CaCl_2 , 1.7 mM ATP.) "A" = tampón imidazol / HCl, 40 mM pH 7.2 . "B" = Tris/ HCl , 40 mM ph 7.6.

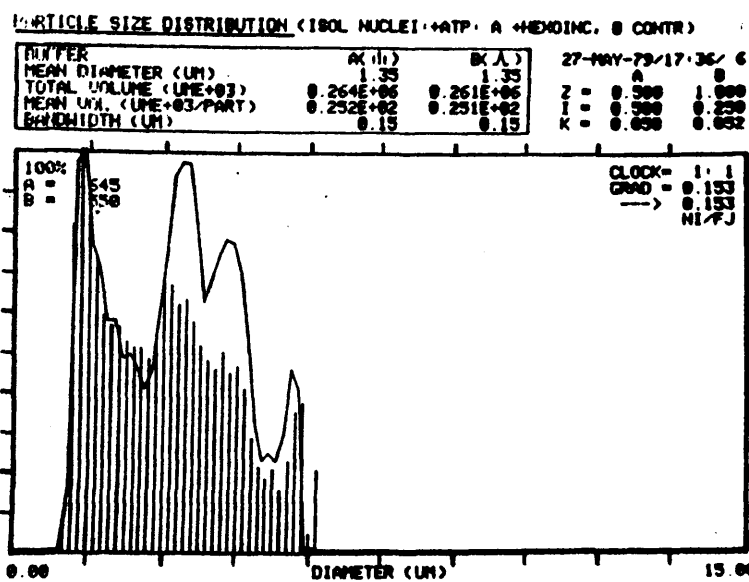


Fig. 16 .-Efecto de la posterior incubaci3n de nucleos "tratados"
(+ ATP), en medio hexoquinasa (+) . " A" = + , "B" = -.

PARTICLE SIZE DISTRIBUTION (ISOL NUCLEI: IMM CA, -ATP:A + HEX, B -HEX.

BUFFER	A (H)	B (A)	27-MAY-79/17.36
MEAN DIAMETER (UM)	3.45	4.20	
TOTAL VOLUME (UM+03)	0.512E+06	0.994E+06	Z = 1.000 0.500
MEAN VOL (UME+03/PART)	0.333E+02	0.639E+02	I = 0.250 0.250
BANDWIDTH (UM)	0.30	0.45	K = 0.052 0.124

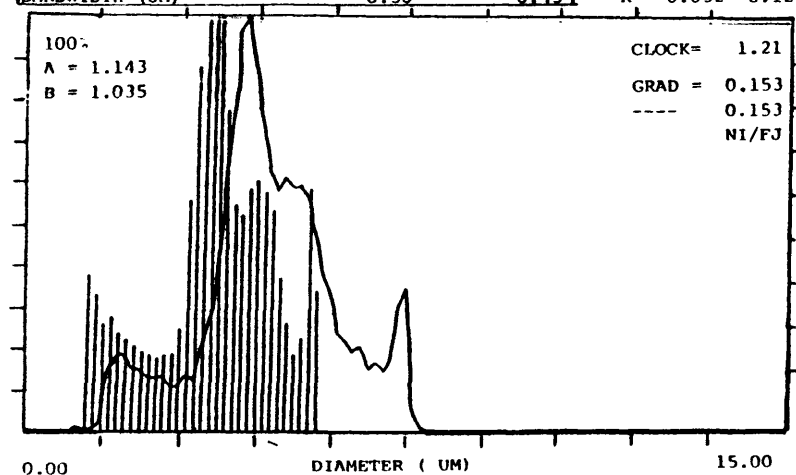


Fig. 17 .- Efecto del "medio Hexoquinasa" en nucleos no tratados con ATP. " A " = + hexoquinasa, " B " = -hexoquinasa

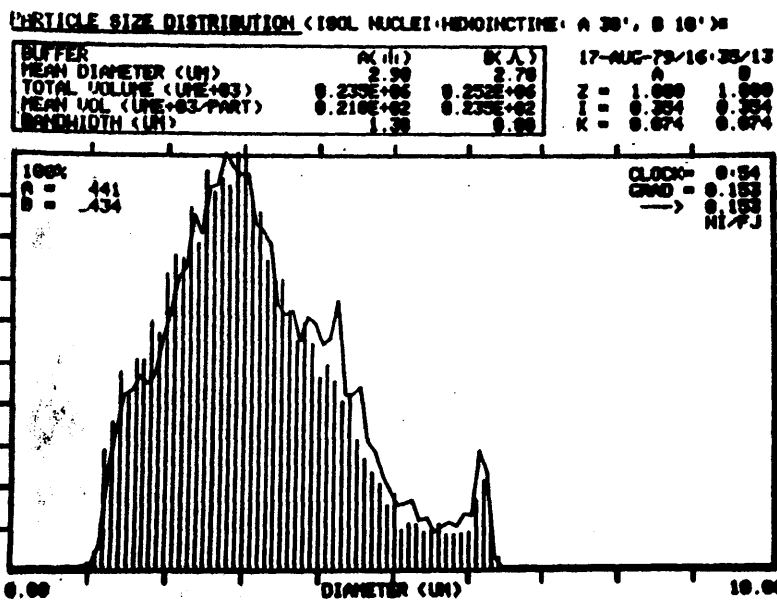


Fig. 18.- Efecto del alargamiento del tiempo de incubación de nucleos " tratados " , suspendidos posteriormente en "medio hexoquinasa " .

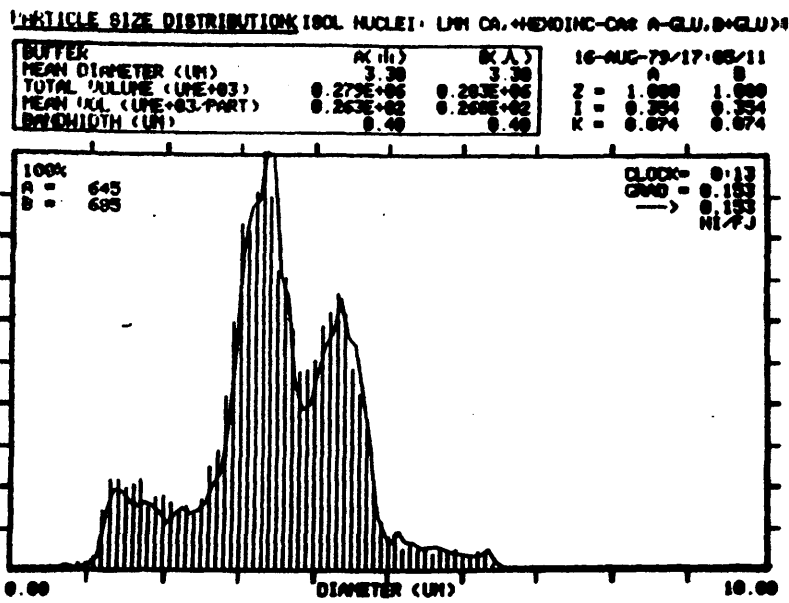


Fig. 19 .- Efecto de la adición de glucosa al medio de suspensión nuclear (concentración 0 y 100 mM).

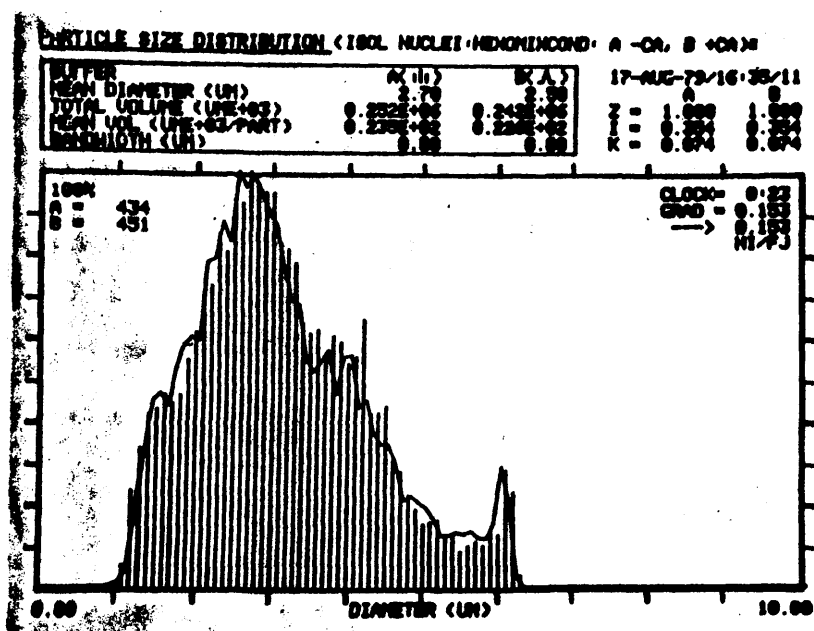


Fig. 20 .- Influencia de la posterior adición de CaCl_2 , en el "medio hexoquinasa", conteniendo nucleos "tratados",

PARTICLE SIZE DISTRIBUTION (ISOL NUCLEI: 5MM CA, A 1000RAD, B CONTR)

BUFFER	A (μ)	B (μ)	24-MAY-79/17.00/5
MEAN DIAMETER (UM)	4.80	4.80	A B
TOTAL VOLUME (UM ³)	0.185E+07	0.185E+07	Z = 2.000 2.000
MEAN VOL (UM ³ /PART)	0.117E+03	0.124E+03	I = 0.500 0.500
BANDWIDTH (UM)	0.75	0.75	K = 0.308 0.308

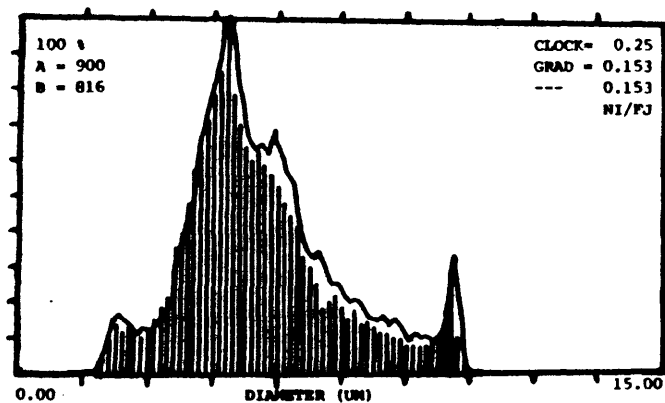


Fig. 21 .- Efecto de la irradiación (1000 rad), sobre nucleos " tratados" y diluidos en "medio hexoquinasa" , caren- te de CaCl_2 , (la concentración final de esta es 3.6 mM)

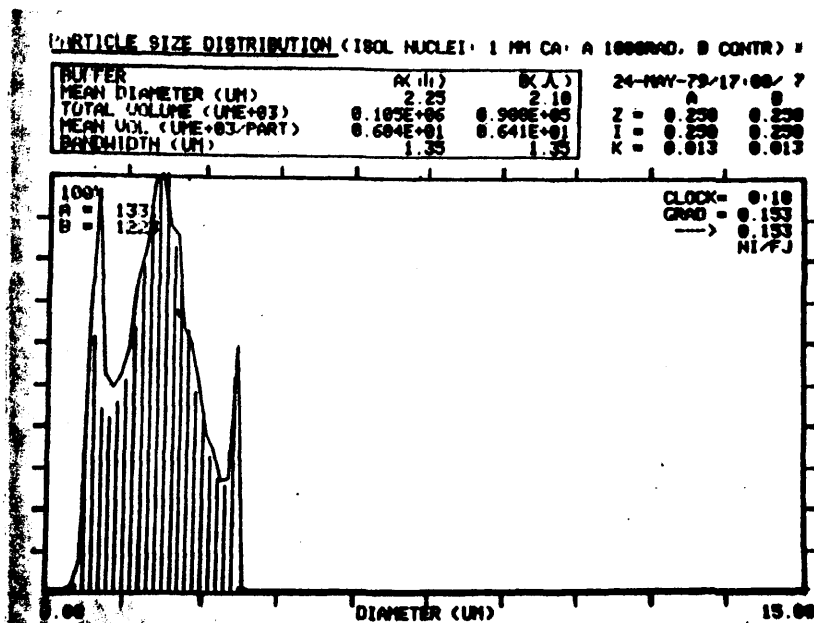


Fig. 22 .- Efectos de los rayos X (1000 rad) sobre nucleos "tratados" y diluidos en "medio hexoquinasa" ($\text{CaCl}_2 = \text{mM}$ 0.7 concentraci3n final.).

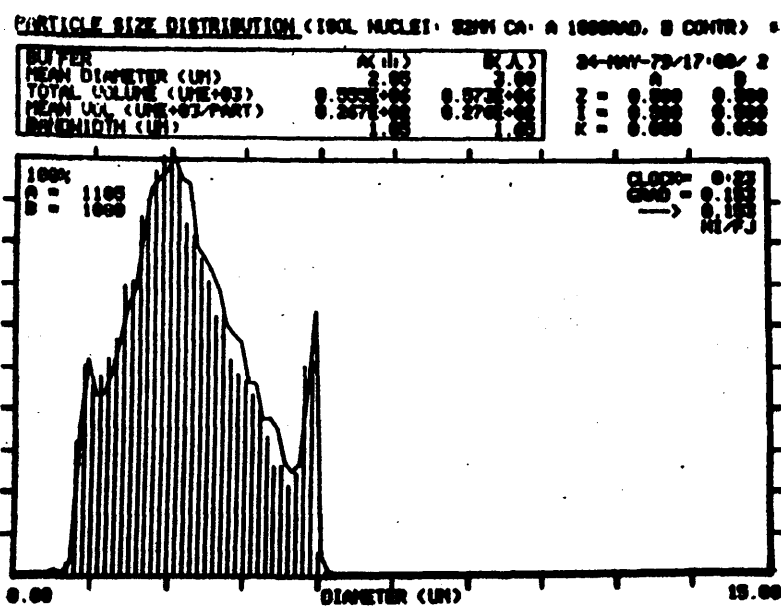


Fig. 23 .- Efecto de la irradiación (1000 rad) de nucleos "tratados" y diluidos en " medio hexoquinasa" (concentración final de CaCl_2 1.4 mM)

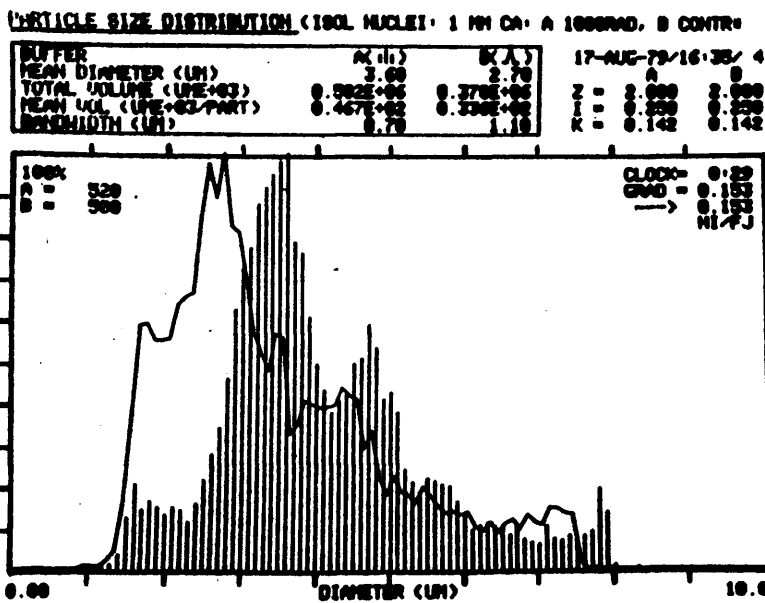


Fig. 24 .-Efecto de los rayos X (1000 rad), sobre nucleos "tra-
tados" , diluidos en " medio hexoquinasa", siendo la
concentraci3n final de CaCl_2 2.2 mM.

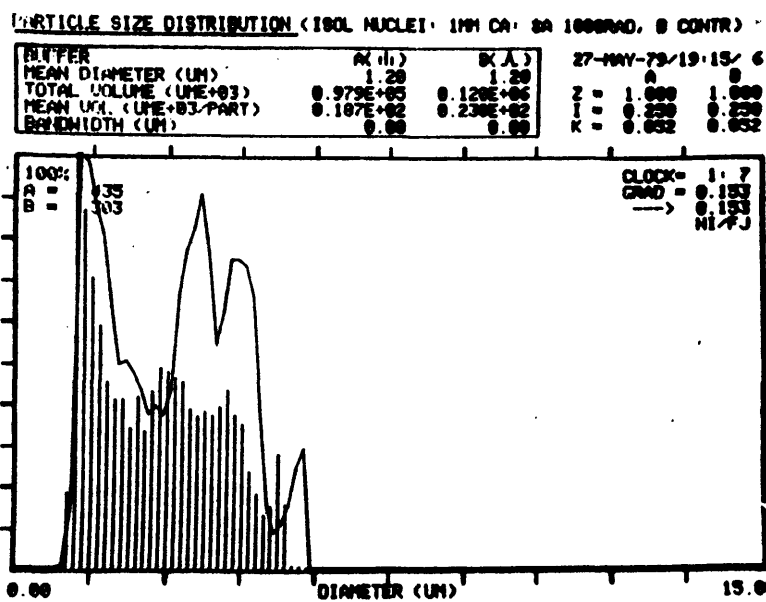


Fig. 25 .- Efecto de la irradiación (1000 rad), sobre nucleos "tratados" y diluidos en "medio hexoquinasa ", siendo la concentración final de CaCl_2 1.4 mM.

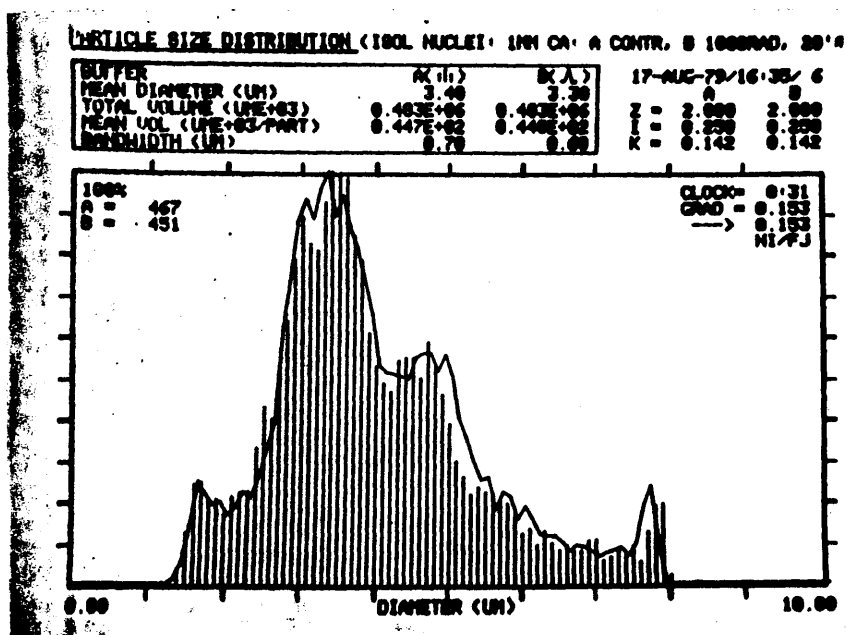


Fig. 26 .- Efecto del tiempo que se mantuvieron los nucleos irradiados (bajo las condiciones descritas en fig.34) en la solución de medida (NaCl 153 mM). "A" = inmediatamente . " B " = despues de 2 min .

10000

DISCUSSION

5.- DISCUSION.

5.1.1. Actividad celular:

La continua observación del cultivo nos muestra en su crecimiento las típicas características de un tejido monolaminar, con las inhibiciones por contacto de las células que hace que éstas se desarrollen en dos dimensiones, siendo de gran importancia la densidad del inóculo a implantar sobre la reproducción y crecimiento del tejido en monocapa. Se observa que este inóculo es de una concentración baja y está dentro de unos límites pequeños resultando pues, una intercomunicación débil (por ejemplo por "chalone" - Prescott D.M.), pero existente, pues al implantar una determinada concentración de células por cm^2 , se produce una estimulación de la multiplicación celular.

5.1.2. Cambios morfológicos en la superficie celular:

La mayoría de los autores coinciden en señalar, que las células del tipo CHO cuando crecen en suspensión, presentan unas prolongaciones citoplásmicas. Esta característica también aparece en las células de nuestro cultivo cuando las suspendemos en el medio de crecimiento F_{12} , después de separarlas de la superficie cristalina por tripsinización. Sin embargo al resuspenderlas en una solución de NaCl (153 mM), se produce un redondeamiento de la célula, acompañado de la desaparición de las protuberancias superficiales. Este fenómeno ya ha sido descrito por diversos autores; en unos casos como indica Prescott (1976) caracteriza la transición de la célula de la fase G_1 a la S del ciclo celular; en otros (Borman y col. 1975) puede ser debido al tratamiento de las células con hormonas o con productos relacionados con AMP cíclico.

En ambos casos trae consigo el paso de la célula en un estado diferente , mientras que en nuestro caso no tienen lugar estas transformaciones fisiológicas , sino que más bien es debido al efecto de la hipoosmolaridad de la solución salina en relación al medio de crecimiento del cultivo, ya que la solución de NaCl (153 mM) equivale aproximadamente a 280 miliosmolar y la del medio es de 329 miliosmolar (tablas Geigy : 290) . Este hinchamiento o turgencia de las células disminuye pasados unos minutos , pero las células no cambian en su forma , ni entran en un estado distinto , ni vuelven a aparecer las prolongaciones citoplásmicas mientras se encuentran en la solución salina.

5.1.3. Controles de infección :

En la bibliografía consultada para detectar las contaminaciones de los cultivos, se nos indica la importancia de unos microorganismos denominados micoplasmas (PPLO), que por sus características no se pueden detectar por los medios comunes utilizados para otros contaminantes de cultivos (p.e. bacterias, virus , etc). Sin embargo su presencia produce alteraciones en propiedades bioquímicas, nutricionales e inmunológicas de los cultivos celulares y pueden dar lugar a la formación de artefactos en los datos experimentales.

Por medio del método utilizado (Chen y col. modificado) conseguimos en corto tiempo , una respuesta rápida sobre el estado de nuestro cultivo . Esto nos permitía eliminar en seguida los cultivos sospechosos , mientras que por el método radioisotópico , debido a su complicada técnica , las probabilidades de error aumentaban y el tiempo se alargaba hasta conocer los resultados , con la consiguiente complicación en la eliminación del cultivo infectado si lo había.

Otro punto a tenerse en cuenta era que al hacerse estos controles con bastante rapidez, se efectuaban más a menudo y de esta forma se detectaban las infecciones debidas a las soluciones utilizadas para los experimentos, otro camino de contaminación de un cultivo.

5.2.1. Aislamiento de los nucleos:

Teniendo en cuenta que la meta de nuestros trabajos de aislamiento era la de conseguir unos nucleos completos, donde sus membranas (interna y externa) permanecieran lo más íntegras posibles, no solo en su estructura sino también en su funcionalidad, comparamos diversos métodos que recogemos en la tabla X que se da a continuación.

Como se puede observar hay una serie de factores que son tratados en todos estos trabajos, a saber: la osmolaridad de la solución de aislamiento, el uso de detergentes, los distintos aparatos utilizados para el tratamiento mecánico y la centrifugación.

Generalmente se utilizan soluciones hipotónicas que al provocar una alteración de las características permeables de la membrana plasmática, producen un hinchamiento en la célula que facilita posteriormente la acción de métodos mecánicos suaves rompiendo la membrana celular sin afectar otras estructuras profundamente.

Otro factor es el tipo de detergente, su concentración y tiempo al que se someten las células a este tratamiento. Diversos autores (Dunnik y col. 1972; Muramatsu y col. 1974, etc) demuestran que utilizando detergentes no iónicos, siempre que la concentración esté entre 0.04-0.3 %, se obtienen mejores resultados que si son iónicos. Facilitándose por medio de estos la separación del material citoplásmico alrededor del nucleo sin alterar su membrana.

Hay algunos puntos al tratar las células con detergentes que no

TABLA X .-

Comparación de diversos métodos utilizados para aislar nucleos.

Autores	Tipo de células	Solucion de aislamiento	Método mecánico	Velocidad centrifugal	Tratamientos especiales
SATO, et al (1967)	Melanoma de ratón B16-C2W	Hipotónica 1% $C_6H_8O_7$ + .2mM $CaCl_2$ + .2mM $MgCl_2$ +	Homogenización con: A) Warning (20 seg.) B) Blender (30 seg.)	600 g, 3min.	70% de los nucleos conservan unicamente la membrana interna.
BORUN, et al. (1967)	HeLa	Isotónica + .5% NP-40 15 min. 4 °C	Homogenización.	600 g, 3min.	Si la concentración de NP-40 es mayor de 1% se rompen los nucleos.
PENMAN (1969) (1975)	HeLa	Hipotónica 10mM NaCl + 10mM Tris/HCl- pH 7.4 + 1.5mM $MgCl_2$ + (10% Tween 40 + 10% Na-DCC, 2:1 o NP-40	"Vorotex" 4seg + Homogenización con: <u>Douce</u>	2000 rpm 2 min. dos veces.	DNasa digestión.
HERSHEY (1973)	HeLa	Hipotónica 10mM Tris/HCl- pH 8.0 + 4mM $MgCl_2$ + 1mM EDTA + 6mM Mercapto- etanol.	Homogenización con: <u>Douce</u> tipo B	800 g, 7min.	El proceso de aislamiento se realiza a una temperatura entre 20° y los 40 °C.
WRAY (1970) (1977)	CH, DON	Hipotónica .5M Hexilglicol + .5mM Pipes - pH 6.7 + 1mM $CaCl_2$	Inyección con aguja 22g, en porciones de 1 ml .	2000 rpm. 3 min.	Temperatura de experimentación fué de 4° C.
MURAMATSU (1974)	HeLa Linfocitos	Hipotónica 10mM Tris/HCl- pH 7.4 + 10mM NaCl + 1.5mM $MgCl_2$	Homogenización con: <u>Potter</u> , dos veces o sonicar.	600 g, 5min. disolviendo en RSB+NP-40+Na- DOC (.2-3% - 1200g, 5min.)	Dos homogenizaciones en .25M sacarosa + 3.3mM $CaCl_2$ + 1200g, 10 min.
MELERO, et al. (1976)	Syrian H.C.	Hipotónica 25mM Hepes- pH 7.6 + 1mM $MgCl_2$ + .5mM $CaCl_2$ + .5% NP-40	"Vorotex" 30 seg.+pipe- tear	800 g, 2-3 min.	

debemos dejar sin control como son : el momento de adición del detergente a la suspensión celular y el tiempo que mantenemos las células en esta disolución . Estos son factores importantes al estar en relación con el estado de permeabilidad de la membrana celular que facilita la entrada del detergente , pero que si se prolonga demasiado hace que las células se "aglutinen " , dificultandose posteriormente la acción mecánica y la separación por centrifugación.

Borman et al (1967) señalan al comparar los efectos producidos por acción de un detergente o por homogenización , que mientras en el tratamiento primero el número de núcleos rotos es inferior al 1 % , no viendose células completas sino que todas las membranas plasmáticas aparecen rotas. En el caso de que las células hayan sido homogenizadas , se ve que hasta un 20 % de células completas (el número varía algo segun el tipo de células), además el número de núcleos rotos es hasta tres veces mayor que por acción del detergente. A esto se unía la formación de vesículas como indica Wallach y col. (1973) , que dificultaban la posterior separación del material citoplásmico del nuclear en la centrifugación. Por último (en nuestro caso de gran importancia) segun el tiempo de homogenización se producía un aumento en la pérdida de la actividad ATPasica (Nievergelt 1976).

Estas desventajas de la homogenización nos hizo prescindir de este método mecánico y en su lugar el del paso por una jeringa mediante el cual obteniamos mayor número de núcleos intactos , sin apenas pérdida de la actividad enzimática, ni contaminaciones citoplásmicas (Brown y col.1977, Wray y col. 1973).

La temperatura bajo la que se realizaron estos experimentos de aislamiento es tambien un factor importante , pues si bien como en la mayoría de los trabajos consultados se indica, que la temperatura más

adecuadas se encuentran entre los 0 y 4° C , ya que así se evitan procesos de aglutinación y enzimáticos , en nuestro caso se producía una pérdida significativa de la actividad enzimática. Además se da lugar a alteraciones en la membrana plasmática y su permeabilidad (Wallag y col. 1973) por esta razón los experimentos se llevaron a cabo a 20°C

Como la observación microscópica de los nucleos al final del proceso de aislamiento , nos pareció un criterio insuficiente para determinar el estado de los mismos y sus membranas, se completó por métodos bioquímicos.

Segun Wallach y otros autores indican que no se conocen enzimas específicas de la membrana nuclear, por lo que elegimos otras que al ser típicas de otros orgánulos dan pruebas de la pureza de los nucleos y carencia de otras contaminaciones citoplásmicas. Elegimos la 5'-nucleotidasa que es una ectoenzima de constitución glicoprotéica presente en las membranas plasmáticas de casi todas las células de mamíferos (Dornand y col. 1978) y tiene una actividad específica alta. La distribución de la actividad específica de esta enzima en los diferentes pasos efectuados hasta aislar los nucleos y en estos , nos dieron resultados coincidentes con los ya publicados por otros autores (De-Maw Chuan y col. 1977) y considerados como suficientes para justificar la pureza de los nucleos.

5.3.1. Actividad enzimática de ATPasas nucleares:

En su comportamiento presentan características semejantes a las ya descritas por Nievergelt (1973) , igualmente se vé una pérdida de la actividad específica bastante grande , sobre todo la estimulada por calcio, en función de la temperatura. Este fenómeno no se puede atribuir a la variación del pH del tampón (cuando a 37° C el pH es 8.0

a 22° C es de 8.45) ya que al medir la actividad enzimática de estas ATPasas en función del tampón se obtiene una pérdida máxima del 20% del total. En nuestras ATPasa sin embargo un cambio de 37° C a 22° c significaba en las estimuladas por Ca^{2+} una pérdida de un 80 % y en las estimuladas por Mg^{2+} (en donde al variar el pH de 8.0 hasta 9.0 se encontraba incluso una estimulación) de -70 %.

Otra característica de estas enzimas , es que al medir su actividad en la suspensión celular obtenemos un valor menor que en los trabajos ya publicados, sobre todo en la estimulada por calcio (aunque también aparece en la estimulada por magnesio, pero menos significativa). Esta menor actividad está acompañada por un desigual reparto que se pone claramente de manifiesto cuando comparamos los cocientes de las actividades estimuladas por calcio en relación a magnesio. En nuestros experimentos este cociente era $\text{Ca/Mg} = 0.7$, frente al 0.57 publicado en trabajos anteriores lo que podemos interpretar, o bien como una mayor actividad de las ATPasas estimuladas por calcio , o una menor actividad de las estimuladas por magnesio.

Estas variaciones pueden muy bien ser debidas al proceso de aislamiento, puesto que al homogenizar se produce no solo rotura de membranas plasmáticas , sino también la de otros orgánulos , con la consiguiente formación de vesículas y contaminaciones de la membrana nuclear, elevándose así la actividad enzimática de esta (simplemente por rotura de mitocondrias se puede obtener una mayor actividad)

Esta menor actividad ATPasica la encontramos también al medir y comparar las actividades específicas de las fracciones nucleares y nucleos aislados, o las de las fracciones citoplásmicas . En las ATPasas estimuladas por Ca^{2+} se observó que un 50% de ella se encontraba en

fracción nuclear, mientras que en nuestros experimentos aparecía solamente el 33 % de la actividad total en los nucleos aislados, lo que atribuimos a una contaminación menor de otras membranas citoplásmicas debido al método de aislamiento utilizado y con ello las ATPasas unidas a estas membranas, causantes de la elevada actividad enzimática encontrada en aquellos experimentos. De todas maneras este 30 a 33 % de actividad encontrado en los nucleos aislados sigue siendo un valor muy significativo .

En general estas ATPasas no presentan un efecto inhibitorio grande por acción de la oligomicina , pues el máximo encontrado fue de un 11% , que se puede atribuir a la estructura de las membranas poco contaminadas por el método de aislamiento usado (comunicación personal de Prof. Carafoli) (Como la oligomicina está formada por más de un componente se pensó primero, en una posible alteración de alguno de sus componentes , debido a lo cual probamos su efecto inhibitorio en ATPasas mitocondriales hepáticas de ratas , obteniéndose los mismos resultados que otros grupos de experimentadores y que los dados en la bibliografía consultada) .

5.4.1. Efectos de las irradiaciones (1000 rad) sobre la actividad enzimática ATPasica :

La comparación de los resultados obtenidos al medir la actividad de ATPasas nucleares de células irradiadas y sus controles nos ponen de manifiesto una disminución de la actividad enzimática más marcada en las estimuladas por calcio que por las de magnesio. Esta pérdida obtenida es más significativa al medir la actividad enzimática en la fracción citoplásmica , que en los nucleos aislados , de lo que

se deduce la existencia de ATPasas estimuladas por calcio que son afectadas de distinta manera por la radiación repartidas en las distintas fracciones, así en la fracción citoplásmica se encuentran unas más sensibles mientras otras más resistentes se encuentran principalmente en los núcleos aislados.

Al irradiar los núcleos aislados y medir en estos la actividad enzimática ATPasica encontramos una pérdida mínima en relación a controles, tanto en la estimulada por calcio que por magnesio, lo que concuerda con los datos anteriores.

5.5.1. Variaciones en el volumen nuclear:

Considerando el efecto osmótico relacionado con la facultad de movimiento de moléculas disueltas a fin de igualar concentraciones diferentes, a través de una membrana semipermeable "capaz de diferenciar" entre soluto y solvente y en el caso de que este sistema semipermeable permanezca cerrado y sea flexible, se podrían medir diferencias osmóticas, por medio de variaciones en el volumen de este sistema. Según esto podríamos considerar el núcleo semejante a un sistema cerrado y flexible dotado de una membrana con capacidad selectiva, produciéndose en ella transformaciones que en parte se manifestarían en una variación del volumen nuclear.

La existencia de una alta actividad enzimática específica de ATPasas nucleares estimuladas por calcio, principalmente, ya ha sido citado por diversos autores (Bul'dyaeva y col. 1972, Kalandarishvili y col. 1977, Mirsky y col. 1964, Creasey y col. 1959, Betel 1967) y como además en su estado funcional aparecen unidas a las membranas, nos indican por un lado su importancia para el núcleo celular, por otro nos sugieren su relación con fenómenos "osmóticos".

Basandonos en estas características de la membrana nuclear y de las ATPasas relacionadas con ellas , vamos a observar el comportamiento del nucleo cualitativamente en relación con el medio que le rodea.

5.5.2. Acción del calcio con o sin la adición del ATP:

Como se observa en resultados , el aumento de la concentración de calcio sin añadir ATP en el medio donde se encuentran suspendidos los núcleos , produce un aumento del volumen de estos , que se puede atribuir a una selectividad y flexibilidad de la membrana nuclear , a pesar de la existencia de los poros nucleares, pues en caso de que no fuera así , no se experimentaría esta variación estable del volumen al aumentar la concentración del calcio en la solución de suspensión.

Timurian (1974) indica en sus trabajos una elevada concentración de calcio en la región nuclear^{va}, acompañada de una fuerte condensación cromosómica durante la mitosis. Según esto si el aumento de calcio se tradujera únicamente en una fuerte condensación cromosómica , sería de esperar una disminución de volumen al " contraerse" los cromosomas parcialmente unidos a la membrana (Letzi 1979) o una "fusión" de ésta como ocurre en la mitosis, efectos que no se observan.

Cuando sin variar la concentración de calcio, añadimos ATP al medio de suspensión nuclear , observamos una disminución del volumen nuclear que se podría interpretar como la consecuencia de una bomba externa de calcio , influida por ATP , sobre un mecanismo contratransporte ("antiport") y por medio de la ATPasa nuclear estimulada por calcio . Esto se realizaría hasta que el gradiente transmembrana de calcio sea equivalente a la concentración de ATP despues de alcanzar el equilibrio.

En trabajos anteriores se encontró que al medir la actividad

ATPasica nuclear en función del tiempo de preincubación, se estimulaba durante un corto tiempo (10 minutos) y después disminuía hasta $\frac{1}{3}$ de la actividad enzimática inicial. Estos resultados nos muestran , las conexiones existentes entre las variaciones del volumen nuclear , el gradiente transmembrana de calcio y la actividad ATPasica. De esta forma despues de un corto tiempo de preincubación en el que el gradiente de calcio sería grande , la actividad ATPasica es tambien grande. Despues al irse reduciendo este gradiente por la actividad de bombeo de la ATPasa, ésta tambien iria disminuyendo su actividad. Ello sugiere que dentro de unos límites determinados se puede mantener este gradiente , fuera de los cuales se reduciría la actividad ATPasica.

Al aumentar la concentración de CaCl_2 en la suspensión nuclear, la relación ATP /calcio va a ser menor, lo que conduce a una reducción del efecto de ATP, el cual no es solo la consecuencia de una competición a nivel molecular , sino más bien de molécula a compartimento (Thomas D. 1976). Otro fenómeno registrado al aumentar la concentración de calcio durante la reacción ATPasica fue una precipitación en el medio de incubación , soluble por ácidos (seguramente hidroxipatito u otro componente de calcio y fosfato). Suponiendo que ésta precipitación produce parte del mecanismo contratransporte , las transformaciones en el volumen nuclear estan influidas , probablemente, solo por el material osmótico activo (calcio soluble). Además segun esto la presión del calcio exterior es posiblemente más pequeña (en relación a la cantidad de calcio transportado) a lo esperado después de la reacción ATPasica, debido a la precipitación de ésta sal , sin olvidar que la capacidad del tampón juega un papel muy importante . Estas características no nos permiten tomar las variaciones de volumen

nuclear como cuantitativas para la determinación del gradiente total.

Cuando la concentración de CaCl_2 es relativamente baja (0.3 mM) al añadir ATP los nucleos se destruyen . Teniendo en cuenta que al observar la suspensión nuclear al microscopio (microscopio de contraste con 400^o aumento) ,despues del tratamiento no se veían fragmentos de membrana , sino que aparecían los nucleos adheridos entre si ,nos hace suponer que esta " destrucción "no es debida a una fuerza mecánica , sino más bien a una salida del calcio desde el interior nuclear inducida por el ATP , provocando esta salida del calcio la disolución de la membrana; fenómeno muy probable si recordamos que para aislar los nucleos con sus membranas era necesario la presencia de calcio como Wray y col. (1970) indican en sus trabajos.

Este proceso de destrucción de la membrana por la distinta aplicación de calcio a ambos lados de ella,se ha puesto de manifiesto en trabajos realizados con la bicapa de fosfatidilcolina que se hace inestable al añadir CaCl_2 ,hasta una concentración de 1 mM , a un lado solamente de la bicapa (Papahadjopoulos y col, 1975, Hauser y col. 1973 , ademas de los ya citados en la introducción).

Otra evidencia de la relación existente entre la salida de calcio y disolución de la membrana la observamos en los experimentos realizados con EGTA,donde su adición en la suspensión celular provoca una disolución semejante a la que tiene lugar con el ATP. Todo esto nos marca la labor de la membrana nuclear como mantenedora de una distinta concentración de calcio entre el nucleo y el citoplasma . Poniendose de evidencia la compartimentación del calcio , no olvidando el papel importantísimo que tiene en las mitocondrias.

Al variar el pH de la solución donde estan suspendidos los nucleos

se manifiesta una disminución del volumen nuclear y no una disolución de sus membranas como en los otros experimentos. Por un lado sabemos de la íntima relación entre el pH y la actividad enzimática de la Ca-ATPasa, según la cual al aumentar la concentración de H^+ en la solución de suspensión se bloquea la actividad enzimática, pudiendo producir este fenómeno, muy posiblemente, una reducción del flujo de Ca^{2+} , reforzándose la proposición de que por influencia del ATP y por medio de las Ca-ATPasas se favorece la efusión de calcio desde el interior del núcleo.

El efecto de disolución que debido al tratamiento con la solución hexoquinasa produce un aumento de volumen de la solución nuclear y una disminución de la concentración de calcio, debería reflejarse en una reducción del volumen nuclear si el flujo de calcio dependiera únicamente de la diferencia de concentraciones en dos "compartimentos" en comunicación (análogo a los efectos osmóticos), lo que se cumple en nuestros experimentos, cuando en la suspensión nuclear no se encuentra presente el ATP. Por el contrario en presencia de éste no aparecen cambios en el volumen lo que atribuimos a la salida de calcio desde los núcleos para aumentar su concentración en el exterior, eliminándose de este modo el efecto de dilución, pues los núcleos se encontrarían de nuevo en el estado anterior al "tratamiento" con la solución hexoquinasa.

La adición posterior de $CaCl_2$ a la suspensión de núcleos "tratados" con ATP no mostraba una variación del volumen como en los no tratados, indicando que la permeación para calcio había sufrido una transformación, efecto que no se puede atribuir a la efusión del calcio por la presencia de ATP residual, ya que por medio de la "trampa

de hexoquinasa" (Rottenberg y col. 1968) lo habíamos impedido.

Otra posibilidad sería el que, por medio del ATP, la membrana de los nucleos hubiese perdido su capacidad de diferenciar específicamente los iones de calcio de otros iones, cosa que nos parece muy improbable a la vista de los resultados obtenidos cuando se irradian las células o los nucleos.

Era de esperar que si por acción del ATP se producían cambios en la permeabilidad de la membrana nuclear originándose un estado "electricamente estable" (cargado), al aplicar los rayos X se provocarían cambios (dosímetro) que se manifestarían por variaciones en el volumen nuclear. Sin embargo bajo las condiciones dadas anteriormente no se veía ninguna variación que podríamos interpretar como ausencia de un campo eléctrico transmembrana (" protónico" $\Delta\mu H = 0$) durante la irradiación. Esto no significa que no hubiese existido ese campo antes de irradiar, sino que había sido de una forma transitoria a través de un mecanismo $Ca^{2+} / 2H^{+}$, cuya existencia ha sido ya demostrada en otros trabajos (Madeira y col. 1979)

Variaciones en el volumen nuclear por acción de las irradiaciones fueron observadas cuando se efectuó la segunda adición de $CaCl_2$ en la solución hexoquinasa (con lo que se "restableció el campo eléctrico") Estas transformaciones en la membrana nuclear producidas al añadir concentraciones diferentes de calcio y que traen consigo aumento (2.2 mM) o disminución (para una concentración de 1.4 mM) del volumen nuclear, conjeturamos que son la consecuencia de una reducción de la diferencia de " cargas" ($\pm \Delta H^{+}$) transmembrana producida por la posterior adición de calcio, por medio de la cual la disposición molecular inducida por el ATP, así como la " resistencia" transmembrana

sería semejante a la de los nucleos suspendido en una solución sin ATP

El comportamiento selectivo de la membrana nuclear respecto al calcio no se pierde al irradiar las células , pues sino, no habríamos encontrado variaciones en el volumen nuclear dependientes de la concentración del calcio en la solución ; sin embargo estas no son por completo iguales a las observadas en nucleos no tratados con ATP. Concluyendo, estas diferencias las podemos atribuir a una variación en el grosor de la membrana (Schoch y col. 1978) que traería como consecuencia la formación de cambios en la capacidad transmembrana , capaces de sostener un gradiente protónico mayor ($-\Delta H$) inducido por calcio, que el que existiría en nucleos no irradiados , ni "tratados" con el ATP.

11501

RESUMEN y CONCLUSIONES

6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Estudios sobre el comportamiento de los núcleos y las ATPasas unidas a ellos, así como también el efecto de la radiación sobre éstos nos muestran la importancia de la membrana nuclear, no solo por su estructura y su función regulatoria, sino posiblemente también como soporte de información relacionada con procesos diferenciadores y por medio de estos con los sistemas neoplásicos.

Células de Hamster de la línea CHO, después de cultivadas fueron tratadas para aislar sus núcleos de tal manera que sus membranas no se deterioraran y de esta forma poder medir la mayor actividad posible de las ATPasas unidas a ella, para lo que se eliminaron principalmente métodos mecánicos bruscos, así como se redujo al mínimo la concentración de detergente. Después de medir las actividades enzimáticas de los núcleos aislados, se compararon con las actividades obtenidas en otros trabajos ya publicados y se procedió a medir los efectos de las radiaciones sobre ellas. Estos experimentos se llevaron a cabo en dos series: una en la que se irradiaban las células completas en suspensión procediéndose posteriormente al aislamiento de los núcleos para controlar la actividad enzimática; otra serie en donde los núcleos ya aislados se irradiaban procediéndose a continuación a la medida de la actividad enzimática. Además paralelamente los núcleos aislados se resuspendieron en el medio de incubación donde fueron sometidos a cambios en la concentración de los componentes (principalmente de la sal cálcica) de este medio, procediéndose a continuación a la medida de la variación del volumen de estos núcleos por acción de los cambios inducidos. También se observaron las variaciones de volumen

en función de la radiación a que fueron sometidos los núcleos, después de haberlos tratados como se describe anteriormente.

Trabajando en estas condiciones hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1ª) Para el aislamiento de núcleos que mantengan su morfología y estén exentos de contaminaciones, ni se presenten aglomeraciones o ruptura de membranas, se siguió el aislamiento a partir del medio F_{12} con una concentración de 10^7 célula/ml, además de detergente P40, se pasó por aguja a 0,72432 mm y posterior centrifugación a 750 g. y prescindiendo de otros métodos mecánicos ~~no~~ trabajando de 0 a 4º, utilizando como enzima de seguimiento la 5'-nucleotidasa. Con esta metodología, consistente en modificación de las convencionales, se han conseguido buenos resultados, fundamentada en la combinación de los métodos de Melero y Wray.

2ª) En los trabajos realizados con las ATPasas nucleares se obtiene una actividad enzimática específica ~~entre~~ tres veces menor que la publicada en trabajos anteriores (Nievergelt reporta 3.5, frente a la nuestra de 1.3), lo que atribuimos principalmente al método de aislamiento. Diversos autores (Madeira, Carafoli, Racker, etc.) muestran que los distintos tratamientos utilizados para obtener las membranas biológicas, deben aplicarse teniendo en cuenta las posibles contaminaciones, formación de nuevas estructuras (vesiculación), así como destrucción (desacoplamiento) de otras enzimas también relacionadas con la membrana, lo que daría como resultado una elevación de la actividad ATPasica. La metodología facilita la separación de restos citoplasmáticos, con sus contaminaciones de nucleotidasa y sin que haya deformación.

3*) Se valora la actividad ATPasa en núcleos aislados, observándose la influencia de las concentraciones de Ca^{++} y Mg^{++} (concentraciones máximas 5mM y 2 mM respectivamente) y proteína, calculando la actividad específica a 37° y 22°C, así como la no influencia de la oligomicina a una concentración final de 4 ug/ml.

4*) Cuando se valora la actividad ATPasica de núcleos procedentes de células irradiadas previamente, la pérdida de la actividad enzimática es de un 20% aproximadamente, en la estimulada por calcio, mientras que en la estimulada por magnesio permanece casi inalterada (4%), lo que concuerda con experimentos publicados y confirma la radioresistencia de esta última.

5*) La actividad ATPasica de núcleos aislados e irradiados presenta un descenso insignificante respecto a los controles en la estimulada por calcio (10%) y permanece constante en las estimuladas por magnesio.

Las diferencias observadas en las pérdidas de actividad según provengan de núcleos o células irradiadas, están justificadas por el estado de las uniones de las ATPasas a la membrana nuclear y el medio en que se irradiaron, que en unas era el citoplasma, mientras que en otros era el medio de aislamiento. Otro punto que también hay que tener en cuenta es el tiempo transcurrido desde que se irradiaron hasta el momento de medida de estas actividades.

6ª) La adición de CaCl_2 al medio de incubación (1 mM- 5 mM) produce un aumento en el volumen nuclear. Es decir, al aumentar la concentración de la sal cálcica cinco veces, los núcleos suspendidos en el medio de incubación incrementan su volumen (cinco veces mayores) respecto al que tenían originariamente. Al añadir EGTA que produce el complejamiento de calcio, se observa una disminución en el volumen nuclear de hasta tres veces, acompañado de la rotura de gran número de núcleos.

7ª) La presencia de ATP en la solución de incubación influye en las variaciones del volumen nuclear inducidas por calcio. Observándose que al concentrar la sal cálcica como en el apartado anterior (1 mM- 5mM) el volumen nuclear aumenta en 19 veces su tamaño con respecto al primitivo.

8ª) Cuando se mantienen los núcleos en un medio ATPasico, el aumento de calcio supone aumento de volumen nuclear, cuando en el medio de ensayo no hay ATP, pareciendo demostrar la influencia de la hexoquinasa es más bien pequeña sobre el volumen nuclear.

9ª) El mantenimiento de los núcleos tratados con ATP, con arreglo a las condiciones de la experiencia, por 30 minutos (buffer A) y 10 minutos (buffer B) con hexoquinasa, no aparecen diferencias, lo que parece indicar que no hay influencia tiempo manipulación.

10ª) En cuanto al efecto de las radiaciones sobre el volumen nuclear, se ha visto que la irradiación por rayos X de suspensiones nucleares en medio ATPasico o de hexoquinasa, no origina variaciones ostensibles del volumen nuclear, comparados con los no irradiados.

11*) La adición posterior de calcio en el medio hexoquinasa, origina variaciones del volumen de los núcleos sometidos previamente a irradiación y así el paso de 1 mM Ca a 1,4 origina una disminución del mismo, con respecto a controles no irradiados. El paso de 1 a 2,2 mM, el volumen de núcleos irradiados era mayor que los controles. Lo que justifica una variación de volumen inducido por la radiación.

12*) Al estudiar los efectos del ClNa sobre volumen de núcleos irradiados, no se encontraron diferencias significativas en los controles.

13*) Nuestro método (Nievergelt-Egido) propuesto para el cálculo de las variaciones de volumen nuclear nos ha resultado eficaz y comparativamente a los medios anteriormente seguidos permite el seguimiento de estas variaciones, con datos inmediatos y reproducibles.

A la luz de los hechos observados sobre la influencia de las radiaciones sobre las ATPasas y el volumen nuclear, hemos podido estudiar unas acciones de membrana, que tienen lugar en un tiempo relativamente corto y que suponemos previas a la acción de estas radiaciones sobre el contenido nuclear.

(2c 6a)

BIBLIOGRAFIA

6.- BIBLIOGRAFIA.

AGUTTER,P., McCaldin,B., and McARDLE,H.J., "Importance of mammalian nuclear-envelope nucleoside triphosphatase in nucleo-cytoplasmic transport of ribonucleoprotein.", Biochem.J. , 182, :811-819 , 1979.

AKERMAN,K.E.O., "Effect of pH on the retention of Ca^{2+} by rat liver mitochondria.", Archv.Biochem. and Biophys. ,189, :256-262, 1978.

AHKONG,Q.G., FISHER,D.,TAMPION,W. and LUCY,J.A., "The fusion of erythrocytes by fatty acids, esters, retinol, and -tocopherol.", Biochem. J. ,136, : 147-155, 1973.

AHRENS,R., "Ueber die Wirkung subletaler Röntgendose auf die Mitochondrien kultivierter Zellen bei gleichzeitiger Darstellung der Mg^{2+} -abhängigen Adenosintriphosphatase.", Strahlentherapie, 143, (5), : 576-587 , 1972.

BAGINSKI, E.S.,FOA,P.P., and ZAK,B., "Microdetermination of inorganic phosphate, phospholipids and total phosphate in biological materials." Clin.Chem., 13, :326-332, 1967 .

BAIRD, M.B.,BIRNBAUM,L.S., and SFEIR,G.T., "NADPH-driven lipid peroxidation in rat liver nuclei and nuclear membranes.", Archv. Biochem. and Biophys., 200, (1), :108-115 , 1980 .

BARRIT,G.J., THORNE,R.F.W., and HUGHES,B.P., "Effects of hormones and N^6O^2 -dibutyryl-adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate, administered in

vivo on phosphate transport and metabolism in isolate rat liver mitochondria.", Biochem.J., 172, :577-585, 1978.

BARTFAI,T., "Cyclic nucleotides in the central nervous system.", TIBS , 3 , (6), :121-124, 1978.

BARTOLI,G.M., DANI,A.,GALEOTTI,T., RUSSO,M., and TERRANOVA,T., "Respiratory activity of Ehrlich Ascites tumour cell nuclei.", Z.Krebsforsch., 83, :223-231, 1975.

BARTOLI,G.M., and GALEOTTI,T., "Growth-related lipid peroxidation in tumour microsomal membranes and mitochondria.", B.B.A., 574, :537-541, 1979.

BERTOLI,E.,FINEAN,J.B., and GRIFFITHS,D.E., "The role of lipid in regulation of mitochondrial adenosine triphosphatase.", FEBS Letters, 61 (2), 1976.

BLOW,M.J.A.,BOTHAM,M.G., and LUCY,J.A., "Calcium ions and cell fusion. Effects of chemical fusogens on the permeability of erythrocytes to calcium and other ions.", Biochem.J., 182, :555-563 , 1979.

BORMAN,L.S., DUMONT,J.N., and HSIE,A.W., "Relationship between cyclic AMP, microtubule organization, and mammalian cell shape." Exptl. Cell Res., 91, :422-428, 1975.

BORUN,T.W.,SCHARFF,M.D., and ROBBINS,E., "Preparation of mammalian polyribosomes with the detergent Nonidet P-40.", B.B.A., 149 ,:302-304, 1967.

BOXER,D.H., "The location of the major polypeptide of the ox heart mitochondrial inner membrane.", FEBS Letters, 59 , (2), :149-152, 1975.

BRETSCHER,M.S., "Major human erythrocyte glycoprotein spans the cell membrane .", Nature New Biology, 231 , :229-232, 1971.

BRETSCHER,M.S., "Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes.", Nature New Biology, 236 , :11-12, 1972.

BUL`DREVA,T.V., KUZMINA,S.N., and ZBARSKII,I.B., "Oxidative phosphorylation in isolated nuclear membranes and nuclei of rat liver cells.", Dokl.Akad.Nauk. USSR, 202 , (2), :467-470, 1972.

BUL`DREVA,T.V., KALANDARISHVILI,F.A., KUZMINA,S.N., and ZBARSKII,I.B., "Phosphorylating apparatus of isolated nuclear membranes of rat liver." Mekh.Regul.Funkts.Klitochnogo Yadra Mater Simp. 4 th, :15-16, 1972.

BYGRAVE,F.L., "Calcium movements in cells." TIBS, 3 , (8), :175-178, 1978.

CHEN,T.R., "In situ detection of mycoplasma contamination in cells cultures by fluorecent Hoechst 33258 stain.", Exptl. Cell Res., 104 , : 255-262 , 1977.

CHENG,S. and LEVY,D., "The effects of cell proliferation on the lipid composition and fluidity of hepatocyte plasma membranes.", Archv.Biochem. and Biophys., 196 , (2), :424-429 , 1979.

CHUANG,De-Maw., HOLLENBECK,R.A., and COSTA, E., "Protein phosphorylation

in nuclei of adrenal medulla incubated with cyclic adenosine 3`5`mono-phosphate-dependent protein kinase.", J.Biol.Chem. , 252, :8365-8373, 1977

CREASEY, W.A., and STOCKEN, L.A., "The effect of ionizing radiation on nuclear phosphorylation in the radio-sensitiviti tissues of the rat." Biochemical J., 72 , :519-523, 1959.

DORNAND, J., REMINIAC, C., and MANI, J.C., "Activité 5`-nucleotidase des membranes plasmiques de lymphocytes. Effect de la concanavaline A.", Biochimie, 59, :425-432, 1977.

DORNAND, J., BONNAFOUS, J.C., and MANI, J.C., "Purification and properties of 5`-nucleotidase from lymphocyte plasma membranes.", Eur.J. Biochem., 87, :459-465, 1978.

DUMONT, J., and Nuñez, J., "Hormones and cell regulation.", 2, Acad.Press. 1978

EBERLE, A., and SCHWYZER, R., "Hormone-receptor interactions. Demostration of two messages sequences (active sites) in α -Melanotropin.", Helvetica Chimica Acta, 58, (6), :1528-1535, 1975.

EBERLE, A.N., "Untersuchungen über die Organisation der Information in α -Melanotropin und Synthese von spezifisch merkierten Analogen zur Rezeptorisolierung.", Diss.ETH. 5735 1976.

EDWARDS-SPODE, J.A., and JONES, C.W., "The properties of adenosine triphosphatase from exponential and synchronous cultures of Alkali-genes eutrophus H16." Biochem.J., 172:253-260., 1978.

FISKUM, G., and LEHNINGER, A. L., "Regulated release of Ca^{2+} from respiring mitochondria by $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$ Antiport." J. Biol. Chem., 254, (14), :6236-6239, 1979.

FISKUM, G., REYNAFARJE, B. and LEHNINGER, A. L., "The electric charge stoichiometry of respiration-dependent Ca^{2+} uptake by mitochondria." J. Bio. Chem., 254, :6288-6295, 1979.

GEIGY DOKUMENTA "Wissenschaftliche Tabellen." 6 Auflage, 1960

FRITZ-NIGGLI, H., "Enzymschädigung durch Röntgenstrahlen.", Radiologia Clinica., 25, (6), :359-370, 1956.

FRITZ-NIGGLI, H. "Inhibited oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria of congenitally jaundiced Gunn rats and the protective action of hydroxyethylrutosides against bilirubin-induced uncoupling." Medicina Experimentalis, 18, :239-246, 1968.

GERLACH, U. and HIBY, W., "5-Nucleotidase", Methoden der enzymatischen analyse, I edit. H. V. Bergmeyer., 1970.

GAD, A. E., BROZA, R. and EYTAN, G. D., "Calcium-induced fusion of proteoliposomes and protein-free liposomes. Effect of their phosphatidylethanolamine content on the structure of fused vesicles.", B. B. A. 556, :181-195, 1979.

GERISCH, G., MALCHOW, D., ROOS, W., and WICK, U., "Oscillations of cyclic nucleotide concentrations in relation to the excitability of Dictyostelium cells." J. Exp. Biol., 81, :33-47, 1979.

GIESE, G. and WUNDERLICH, F., "Increased fluidity and loss of temperature and Ca^{2+} or Mg^{2+} sensitivity in nuclear membranes upon removal from the membrane-associated nuclear matrix proteins ." , J.Biol.Chem. 255 , (4) , :1716-1721 , 1980 .

GUPTA, K.C. , TURNER, F.R. and TAYLOR, M.W., "Calcium-mediated cell surface changes in chinese hamster cells." , Eptl. Cell Res. , 120 , :39-46, 1979.

HANSON, J.C. , "The effects of versene on dividing sea urching eggs." Dissertation abstracts, 68 , :2546 , 1968.

HARRIS, P., "the role of membranes in the organization of the mitotic apparatus." Exptl. Cell Res., 94 , :409-425, 1975.

HARRIS, J.R., " Fractionation of the nuclear envelope." , Membranous elements and movements of molecules. Methodological surveys. , 6 , Edits. E.Reid , E.Herwood and J.Wiley, 1977.

HARRISON , R. and LUNT, G.G. , "Biological membranes . Their structure and function." , edits Blackie, Glasgow and London., 1975.

HARTREE, E.F. , "Determination of protein : A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response ." Analytical Biochem 48 , :422-427 , 1972.

HASSELBACH, W., MAKISON, M. and MIGALA, A., "Calcium transport and ATP turnover in the sarcoplasmic membrane." Mechanism in Bioenergetics eds. Azzone Ernster, Papa, Quaglianella, Siligierandi, A.P. :219-237, 1973

HAUSER,H.,LEVINE,B.A., and WILLIAMS,R.J.P., "Interactions of ions with membranes.", TIBS, 1, :278-281, 1976.

HERLAN,G.,GIESE,G., and WUNDERLICH,F., "Influence of nuclear membrane lipid fluidity on nuclear RNA release.", Exptl.Cell Res., 118, :305-309, 1979.

HERSHEY,H.V.,STIEBER,J.F., and MUELLER,G.C., "DNA-synthesis in isolated HeLa nuclei. A system for continuation of replication in vivo.", Eur. J. Biochem., 34, :383-394, 1973.

HESS,B.,BOITEUX,A.,BUSSE,H.G., and GERISCH,G., "Spatiotemporal organization in chemical and cellular systems.", Adv.in Chem. Phys., XXIX, :137-168, 1975.

HUGHES,B.P., and BARRIT,G.J., "Interaction between glucocorticoids and glucagon in the hormonal modification of calcium retention by isolated rat liver mitochondria.", Biochem.J., 180, :291-295, 1979.

JOHNSON,R.T., and RAO,P.N., "Mammalian cell fusion :induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei.", Nature, 226, :717-722, 1970.

JUNG,D.W., and BRIERLEY,G.P., "Energy-dependent contraction of swollen heart mitochondria-activation by butacaine .", Archv.Biochem. and Biophys 193, (1), :76-87, 1979.

KALANDARISHVILI,F.A.,KUZ`MINA,S.N., and ZBARKII,I.B., "Oxidation and phosphorylation in rat liver nuclei and nuclear membranes during post-

natal development and regeneration (of the liver) after partial hepatectomy.", *Biokhimiya* 42, (7), :1167-1172, 1977.

KAUPP, U.B., SCHNETKAMP, P.P.M., and JUNGE, W., "Light-induced calcium release in isolated intact cattle rod outer segments upon photoexcitation of rhodopsin", *B.B.A.*, 552, :390-403, 1979.

KLEIN, R.L., and AFZELIUS, B.A., "Nuclear membrane hydrolysis of adenosine triphosphate.", *Nature*, 212, :609, 1966.

KLOUWEN, H.M., and BETEL, I., "Oxidative phosphorylation in nuclei isolated from rat thymus.", *The cell nucleus metabolism & radiosensitivity*. Eds. Taylor & Francis. LTD., 1966.

KNUTTON, S., and PASTERNAK, C.A., "The mechanism of cell-cell fusion." *TIRS*, 4, :220-223, 1979.

KRYSTAL, G.W., and POCCIA, D., "control of chromosome condensation in the sea urchin egg.", *Exptl. Cell Res.*, 123, :207-219, 1979.

KUMAR, G., DEVES, R., and BRODIE, A.F., "Active transport of calcium in membrane vesicles from *Mycobacterium phlei*.", *Eur. J. Biochem.*, 100, :365-375, 1979.

LARRAGA, V., and MUÑOZ, M., "Molecular organization in bacterial membranes. Specific labelling and topological distribution of glycoproteins and proteins in *Streptomyces albul* membranes." *Eur. J. Biochem.*, 54, :207-218, 1975.

LEHNINGER, A.L. , Biochemie., Verlag Chemie-Weinheim. N.Y. 1977.

LEZZI, M., and ROBERT, M. , "Chromosomes isolated from unfixed salivary glands of Chironomus.". Results and Problems in Cell Differentiation. 4, :35-57, 1972.

LEZZI, M. and WUHRMANN, P. , " Kombinationsschloss am genetische Safe." Bild der Wissenschaft, 4 ,:62-82, 1979.

LOCKAU, W., "The inhibition of photosynthetic electron transport in Spinach chloroplasts by low osmolarity.", Eur.J. Biochem., 94, :365-373, 1979.

LORWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., and RANDALL, R.J., "Protein measurement with the folin phenol reagent." , J.Biol.Chem., 193, :265 , 1951.

LUTHRA, R., and OLSON, M.S., "The effects of chlorotetracycline on calcium movements in isolated rat liver mitochondria.", Archv. Biochem. Biophys. , 191 , (2), :494-502, 1978.

MACIEIRA-COELHO, A., BOURNOUTIAN, C., and AVRAMEAS, S., "The role of the cell membrane in the expresion of contact inhibition of division." Biol. Cellulaire , 32, :121-126, 1978.

MADEIRA, V.M.C., and ANTUNES-MADEIRA, M.C., "Interaction of Ca^{2+} and Mg^{2+} with synaptic plasma membranes." , B.B.A. , 323, :396-407, 1973.

MADEIRA, V.M.C., "Alkalinization within sarcoplasmic reticulum during

the uptake of calcium ions.",Archv.Biochem.Biophys., 193, :22-27, 1979.

MADEIRA,V.M.C., "Proton movements across the membranes of sarcoplasmic reticulum during the uptake of calcium ions.",Archv. Biochem.Biophys., 200, (2),:319-325, 1980.

MAEDA,T.,ELDRIDGE,C.,TOYAMA,S.,OHNISHI,S.,ELSON,E.I., and WEBB,W.W., "Membrane receptor mobility changes by Sendai virus.",Exptl.Cell Res. 123, :333-343, 1979.

MAEKAWA,A., "Electrophoretic mobility of isolated nuclei from rat ascites hepatoma cells and normal liver cells.",Nagoya Med.J., 13, :215-230 , 1967.

MAZIA,D.,PETZELT,Chr.,WILLIAMS,R.O., and MEZA,I., "A Ca-activated ATP-ase in the mitotic apparatus of the sea urchin egg (isolated by a new method).",Exptl.Cell Res.,70, :325-332, 1972.

MAZIA,D., "The chromosome cycle in the cell cycle.", Cell cycle controls ,:265-271,.Eds.G.M.Padilla,I.L.Cameron, A.Zimmerman. Acad.Press., 1974.

MELCHERS,F., "Lymphocyte membranes in lymphocyte functions.",Perspectives in membrane biology. Eds.S.Estrada, O.C. Gitler., :531-559, Acad.Press. ,1974.

MELERO,J.A.,SALAS,J.,and SALAS,M.L., "Subcellular distribution of DNA-

binding proteins from cultured Hamster fibroblasts.", B.B.A., 437 , :462-476, 1976.

MIKI, T., "The ATPases activity of the mitotic apparatus of the sea urchin egg." Exptl. Cell Res., 29, :92-101, 1963.

MITCHELL, P., and MOYLE, J., "Acid-base titration across the membrane system of rat-liver mitochondria." Biochem. J. 104 , :588-600, 1967.

MITCHELL, P., "Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation.", Biol. Rev. Camb. Phil. Soc., 41 , :445-502, 1966.

MITCHELL, P., "Cation-translocating ATPases models." FEBS Lett., 33, :267-274 , 1973.

MOHRI, H., "The function of tubulin in motile systems.", B.B.A., 85, :85-127, 1976.

MUÑOZ, E., "Evolución en la estructura y función de los sistemas de Membrana.", :1-39, Biología celular y molecular. Edts. C. Vicente de Córdoba . H. Blume , 1979.

MURAMATSU, M., HAYASHI , Y., ONISHI, T., SAKAI, M., TAKAI, K., and KASHIYAMA, T. "Rapid isolation of nucleoli from detergent purified nuclei of various tumor and tissue culture cells.", Exptl. Cell Res., 88, :345-351, 1974,

NATHAN, I., FLEISCHER, G., LIVNE, A., DVLANSKY, A. and PAROLA, A. H., "Membrane microenvironmental changes during activation of human blood platelets

by trombin.", J.Biol.Chem., 254, (19), :9822-9828, 1979.

NERNST, "Biophysik . Eine Einführung für Biologen,Mediziner und Physiker.", I, :344., Edts. W.Laskowski and W.Pohlit. Verlag G.Thieme,1974.

NICHOLLS,D., "Calcium transport and proton electrochemical potential gradient in mitochondria from Guinea-pig cerebral cortex and rat heart. Biochem.J., 170, :511-522 , 1978.

NICOLIS,G., "Dissipative instabilities, structure, and evolution.", Advances in chemical physics., 29, :29-47, 1975.

NICOLSON, G.L.,POSTE,G., and JI, Th., "The dynamics of cell membrane organization : in cell surface.", Dynamics of cell membrane. 3, :1-126 1977.

NIEVERGELT,M., "Calcium activated adenosintriphosphatase in cultured Chinese hamster cells.", Experientia, 29, :746, 1973.

NIEVERGELT,M. "Eigenschaften der Ca-und Mg-stimulierten ATPase(n) von Chinesischen Hamster-Zellkulturen und Untersuchungen in Zusammenhang mit strahlinduzierten Mitoseverzögerung Thymidin-synchronisierter Kulturen.", Diss. ETH. Nr. 5731. , 1976.

OHNISHI,S.T., "A method for studying the depolarization-induced calcium ion release from fragmented sarcoplasmic reticulum.", B.B.A.,587, :121-128, 1979.

PARVIN,R. and SMITH, R.A., "Determination of inorganic phosphate in the

presence of labile organic phosphates.", Analytical Biochem., 27, :65-72, 1969.

PENMAN, S., "Preparation of purified nuclei and nucleoli from mammalian cells.", Fundamental techniques in virology., :35-71, .Eds. K. Habel & N. L. Salzman. Acad Press. London, N. York. , 1969.

PETERSEN, D. F., ANDERSON, E. C., and TOBEY, R. A., "Mitotic cells as a source of synchronized cultures.", Methods in cell physiologie. , :347-371, . eds. Prescott. 1968.

PETZELT, Ch., " Ca^{2+} -activated ATPase during the cell cycle of the urchin *Strongylocentrotus purpuratus*." Exptl. Cell Res., 70, :333-339, 1972.

PETZELT, Ch., "UV-irradiation of sea urchin eggs changes the course of the Ca^{2+} -activated ATPase activity.", Exptl. Cell Res., 86, :404-408, 1974.

PETZELT, Ch., " NH_3 -treatment of unfertilized sea urchin eggs turns on the Ca^{2+} -ATPase cycle.", Exptl. Cell Res. , 102, :200-204, 1976.

PISAREVA, L. N., KOMKOVA, A. I., and DUMLOVA, E. V., "Interaction between histones and membranous adenosintriphosphatase.", Tsitologiya, 12 , :1405-1411, 1971.

PISAREVA, L. N., IVANOVA, G. I., "Correlation between activation and inhibition of enzymic activity of Na, K-ATPase during its interaction with

histones.", Tsitologiya , 14, (8), :975-980, 1972.

POLLAK, J.K., and SUTTON, R., "The differentiation of animal mitochondria during development.", TIBS, 5(1), :23-27, 1980.

PRESCOTT, D.M., "Reproduction of Eukaryotic Cells." . Eds. Acad. Press New York, London, S. Francisco. 1976.

PRIGOGINE, I., and LEFEVER, R., "Stability and self-organization in open systems.", Advances in chemical physics. , 29, :1-28, .Eds. Nicolis G. and R. Lefever. 1975.

PRIGOGINE, I. and LEFEVER, R., "Coupling between diffusion and chemical reactions.", Molecular movements and chemical reactivity as conditioned by membranes, enzymes and other macromolecules. , :1-29, .Eds. R. Lefever and A. Golbeter. 1978.

RAAPHORST, G.P., and KRUUV, J., "Effect of tonicity on radiosensitivity of mammalian cells.", Int. J. Radiat. Biol., 29(5), :493-500, 1976.

RAAPHORST, G.P., and KRUUV, J., "Effects of salt solutions on radiosensitivity of mammalian cells. II Treatment with hypotonic solutions.", Int. J. Rad. Biol., 32(1), :89-101, 1977.

RACKER, E., "A new look at mechanisms in bioenergetics.", Acad. Press. New York, London, S. Francisco. 1976.

REGA, A.F., and GARRAHAN, P.J., "Calcium ion-dependent dephosphorylation

of the Ca^{2+} -ATPase of human red-cells by ADP." B.B.A., 507, :182-184, 1978.

REGAN, C.M., GRIP, W.J., DAEMEN, F.J.M., and BONTING, S.L., "Biochemical aspects of the visual process. Sulfhydryl group reactivity as a probe of transient protein conformational changes during rhodopsin photolysis.", B.B.A., 537, :145-152, 1978

RICHTER, C., WINTERHALTER, K.H., and CHERRY, R., "Rotational diffusion of cytochrome P-450 in rat liver microsomes .", FEBS Letters 102, :151-154, (1), 1979.

RILEY, D.E., KELLER, J.M. and BYERS, B., " The isolation and characterization of nuclear ghosts from cultured HeLa cells.", Biochem., 14, (13), :3005-3015, 1975.

ROSENFELD, A.C., ZACKROFF, V.R., and WEISENBERG, R.C., "Magnesium stimulation of calcium binding to tubulin and calcium induced depolymerization of microtubules.", FEBS Letters, 65 (2), :144-147, 1976.

ROTTENBERG, G.H. and CAPLAN, R.S., "A thermodynamic appraisal of oxidative phosphorylation with special reference to ion transport by mitochondria .", Membranes and Ion transport. :165-191. 1968.

SATO, Ch., KOJIMA, K., MATSUZAWA, T., and HINUMA, Y., "Relationship between loss of negative charge on nuclear membrane and loss colony-forming ability in X-irradiated cells.", Radt.Res., 62 :250-257, 1975.

SAUK, J.J., WHITE, J.G., and WITKOP, C.J. Jr., "Alteration in the surface

morphology of synchronized B-16 melanoma cell during the cell cycle." *Acta Dermatovener*, 55, :331-336, 1975.

SCHLEGEL, W., "On the role of glycoproteins in hormone action: stabilization of ACTH stimulation of adenylate cyclase in isolated adrenocortical plasma membranes by concanavalin A.", *FEBS Letters*, 69, (1), :67-69, 1976.

SCHNEIDER, E. L., STRANBRIDGE, E. J. and EPSTEIN, C. J., "Incorporation of ³H-uridine and ³H-uracil into RNA." *Exptl. Cell Res.*, 84, :311-318, 1974.

SCHOCH, P., SARGENT, D., and SCHWYZER, R., "Capacitance and conductance as Tools for the measurement of asymmetric surface potentials and energy barriers of lipid bilayer membranes." *Membrane Biol.*, 46, :71-89, 1979.

SCHWARZ, G., "Quantitative analysis of activation and inactivation of asymmetry currents in biological membranes, based on a conformational transition model.", *J. Membr. Biol.*, 43, :149-167, 1978.

SCHWARZ, G., "On the physico-chemical basis of voltage-dependent molecular gating mechanisms in biological membranes.", *J. Membr. Biol.*, 43, :127-148, 1978.

SCHWYZER, R., "ACTH: a short introductory review." *Annals of the New York Academy of Sciences*, 297, : 3-26, 1977.

SHIMADA, O., and YASUDA, H., "Lipid peroxidation and its inhibition by tinoridina. II. Ascorbic acid-induced lipid peroxidation of rat liver

mitochondria .", B.B.A., 572, :531-536, 1979.

SIEDOW, J.N., HUBER, S.C., and MORELAND, D.E., "Effects of dibromothymoquinone on mug bean mitochondrial electron transfer and membrane fluidity" B.B.A., 547, :282-295, 1979.

SINGER, I.I., "Microfilament bundles and the control of pinocytotic vesicle distribution at the surfaces of normal and transformed fibroblasts.", Exptl. Cell Res. , 122 , :251-264, 1979.

SKULACHEV, V.P., "Membrane electricity as a convertible energy concurrency for the cell.", Can. J. Biochem., 58, :161-175, 1979.

SPADAFORA, C., OUDET, P., and CHAMBON, P., "Rearrangement of chromatin structure induced ionic strength and temperature.", Eur. J. Biochem., 100 :225-235, 1979.

STECK, T.L., and DAWSON, G., "Topographical distribution of complex carbohydrates in the erythrocyte membrane." J. Biol. Chem., 249, (7), :2135-2142, 1974.

STRAZHEVSKAYA, N.B., "Radiation damage to cell membranes." Chapt. 6, :179-214, 1974. Molecular Radio-Biology.

TERASIMA, T., and TOLMACH, L.J., "Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells.", Biophys. J., 3, :11, 1963.

THOMAS, D., "Diffusion-reaction in structured media and membranes bea-

ring enzymes.", Advances in chemical physics. XXXIX, :229-233, Eds. I. Prigogine and S.A. Rice, 1978.

THORN, N.A., RUSSELL, J.T., TORP-PEDERSEN, Ch., and TREIMAN, M., "Role of calcium in release of neurohypophyseal hormones.", Hormones and cell regulation. , 2, :285-301, Eds. J. Dumont and J. Nunez. 1978.

TYLNEY, L.G., and MARSLAND, D., "A fine structural analysis of cleavage induction and furrowing in the eggs of *Arbacia punctulata*.", J. Cell Biol., 42, :170, 1969.

TIMOURIAN, H., JOTZ, M.M., and CLOTHIER, G.E., "Intracellular distribution of calcium and phosphorus during the first cell division of the sea urchin egg.", Exptl. Cell Res. 83, :380-386, 1974.

TOBEY, R.A., PETERSEN, D.F., and ANDERSON, E.C., "Biochemistry of G_2 and Mitosis.", The cell cycle and Cancer, :309-353, eds. M. Dekker, 1971.

TREWAVAS, A., "What is the molecular basis of plant hormone action?." TIBS, 4, (9), :199-202, 1979.

VAN DAM, K., and MEYER, A.J., "Oxidation and energy conservation by mitochondria.", Annual Review of Biochemistry, 40, :115-160, eds. Snell, E.E. Böyer, P.O., Meister, A., Sinsheimer, R.L., 1971.

VERCESI, A., REYNAFARJE, B., and LEHNINGER, A.L., "Stoichiometry of ^+H ejection and Ca^{2+} uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria.", J. Biol. Chem., 253, (18), :6379-6385, 1978.

VOGEL, K.G., "Effects of hyaluronidase, trypsin, and EDTA on surface composition and topography during detachment of cells culture.", Exptl. Cell Res., 113, :345-357, 1978.

VOLSKY, D.J. and LOYTER, A., "Role of Ca^{2+} in virus-induced membrane fusion. Ca^{2+} accumulation and ultrastructural changes by Seandai virus in chicken erythrocytes.", J. Cell Biol., 78, :465-479, 1978.

WALLACH, D.F.H., and LIN, P.S., "A critical evaluation of plasma membrane fractionation.", B.B.A., 300, :211-254, 1973.

WALTERS, R.A., and HILDEBRAND, C.E., "A procedure for the rapid lysis of mammalian cells prior to alkaline sucrose density gradient centrifugation.", B.B.A., 407, :120-140, 1975.

WANNER, O., "Dynamisches modell der Oxytocinwirkung auf den depolarisierten Rattenuterus.", Diss. ETH. 5707. 1976.

WARREN, L., BUCK, C.A., and TUSZYNSKI, G.P., "Glycopeptide changes and malignant transformation a possible role for carbohydrate in malignant behavior.", B.B.A., 516, :97-127, 1978.

WEISENBERG, R., and TAYLOR, E.W., "Studies on ATPase activity of sea urchin eggs and the isolated mitotic apparatus.", Exptl. Cell Res., 53, :372-384, 1968.

WHITFIELD, J.F., RIXON, R.H., and YODALE, T., "Prevention of mitotic delay in irradiated suspension cultures of L mouse cells by agmatine.", Exptl. Cell Res., 27, :143-195, 1962.

WHITFIELD, J.F., and YODALE, T., "The effects of calcium, agmatine and phosphate on mitosis in normal and irradiated populations of rat thymocytes.", *Exptl. Cell Res.*, 43, :602-610, 1966.

WILLIAMS, M.M.D., "Significance of Rad, R, Rem, and related units.", *Ann. J. Röntgenol.*, 96, :794-802, 1966.

WILSON, J.E., "Ambiguous enzymes : variation in intracellular distribution as a regulatory mechanism.", *TIBS*, :124-126, 1979.

WRAY, W., and STUBBLEFIELD, E., "A new method for the rapid isolation of chromosomes, mitotic apparatus, or nuclei from mammalian fibroblasts at near neutral pH.", *Exptl. Cell Res.*, 59, 469-478, 1970.

WRAY, W., "Isolation of metaphase chromosomes, mitotic apparatus, and nuclei.", *Methods in Cell Biology.*, VI, :283-305, eds. D.M. Prescott 1973.

WUETHRICH, A., SCHATZMANN, H.J., and ROMERO, P., "Net ATP synthesis by running the red cell calcium pump backwards.", *Experientia*, 35, :1589 1979.

YASUZUMI, G., TSUBO, I., OKADA, K., TERAWAKI, A., and ENOMOTO, Y., "The fine structure of nuclei as revealed by electron microscopy. V. Intranuclear inclusion bodies in hepatic parenchymal cells in cases of serum hepatitis.", *J. Ultrastructure Res.*, 23, 321-332, 1968.

ZADE-OPPEN, A.M., SCHOOLER, J.M., COOK, Jr. P. and TOSTESON, D.C., "Effect

of membrane potential and internal pH on active sodium-potassium transport and on ATP content in high-potassium sheep erythrocytes." B.B.A., 555 , : 285-298 , 1979.

REDMANN,K.,REICHEL,G."Die Wirkung von Röntgenstrahlen auf das Transmembranpotential und die elektrophoretische Beweglichkeit polymorphkerniger Granulozyten und FL-Zellen ." ,Rad. and Environm.Biophys., 14 :21-30,1977 .

ALTMAN,K.I.,GERBER,G.B.,and OKADA,S. " Radiation Biochemistry" I,II edt. Acad. Press. 1970

METCALFE, J.C., HESKETH,T.R.,SMITH,G.A. and POZZAN,T. "Mitogen Receptors and signalling mechanisms in lymphocyte plasma membranes" 13th FEBS MEETING , :36 , 1980.

NAGY. Zs. I. " Further developments in the membrane hypothesis of aging . FEBS Meeting (13 th) 1980.

PASTERNAK, C. CORDA,D., STIEVE,H., and SHINITZKY.M, " Light-induced in dynamic properties of photosensory membranes". 13th FEBS MEETING : 28 , 1980.